

Die Aktivierung der Signalkinase TcsC und des *High Osmolarity Glycerol* (HOG) Signalwegs in *Aspergillus fumigatus* als neue Strategie zur Therapie invasiver Schimmelpilzmykosen

von

Anja Regina Spadinger

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

**Die Aktivierung der Signalkinase TcsC und des *High
Osmolarity Glycerol* (HOG) Signalwegs in
Aspergillus fumigatus als neue Strategie zur Therapie
invasiver Schimmelpilzmykosen**

von Anja Regina Spadinger

aus Villingen-Schwenningen

München 2018

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Bakteriologie und Mykologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:

Prof. Dr. rer. nat. Frank Ebel

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, PhD

Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Frank Ebel

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Dr. habil. Manfred Gareis
Univ.-Prof. Dr. Holm Zerbe
Priv.-Doz. Dr. Wolfram Petzl
Priv.-Doz. Dr. Marlon R. Schneider

Tag der Promotion: 10. Februar 2018

Für meine Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG.....	1
II.	LITERATURÜBERSICHT.....	3
1.	<i>Aspergillus fumigatus</i>	3
1.1.	Taxonomie und Bedeutung	3
1.2.	Morphologie, Lebenszyklus und Habitat von <i>A. fumigatus</i>	4
2.	Bedeutung in der Humanmedizin	6
2.1.	Die allergisch bronchopulmonale Aspergillose (ABPA).....	7
2.2.	Das Aspergillom (Pilzball).....	7
2.3.	Die invasive Aspergillose (IA).....	8
3.	Bedeutung in der Veterinärmedizin.....	11
3.1.	Die Aspergillose des Geflügels und anderer Vögel.....	11
3.2.	Die Aspergillose der Wiederkäuer	13
3.3.	Die Aspergillose des Pferdes.....	15
3.4.	Die Aspergillose bei Hund und Katze	16
3.5.	Die Aspergillose der Meeressäuger	17
4.	Methoden für die Diagnostik von Aspergillosen.....	18
4.1.	Diagnostische Methoden in der Humanmedizin	18
4.2.	Diagnostische Methoden in der Veterinärmedizin	20
5.	Aktueller Stand der antifungalen Therapie.....	21
6.	Der <i>High Osmolarity Glycerol</i> (HOG) Signalweg.....	24
6.1.	Die Stressantwort über den HOG-Signalweg in <i>A. fumigatus</i> und sein Potenzial als Angriffspunkt für neue, antifungale Therapeutika.....	24
6.2.	Zwei-Komponenten-Systeme und Hybrid-Histidin-Kinasen (HHK) in pathogenen Pilzen.....	27
III.	PUBLIKATIONEN	31
1.	Publikation 1	31
2.	Publikation 2	41
IV.	DISKUSSION	51
1.	Die Notwendigkeit der Entwicklung neuer antifungaler	

	Therapiemöglichkeiten	51
1.1.	Das Problem der Resistenzbildung gegen die Gruppe der Azole	51
1.2.	Neue therapeutische Probleme durch Infektionen mit Nicht- <i>Aspergillus</i> Schimmelpilzen	52
1.3.	Die Typ III Hybrid-Histidin-Kinase TcsC und der HOG-Signalweg als geeigneter Angriffspunkt für die Entwicklung neuer Therapeutika	53
2.	Hybrid-Histidin-Kinasen als positive oder negative Regulatoren des HOG-Signalwegs	57
3.	Die proximale HAMP-Domäne reguliert die Aktivität des Kinase-Moduls	60
4.	Interaktionen zwischen TcsC-Molekülen	63
5.	Die Bedeutung der Lokalisation von TcsC	64
6.	Die Identifizierung neuer HOG-aktivierender Substanzen	67
V.	ZUSAMMENFASSUNG	71
VI.	SUMMARY	73
VII.	LITERATURVERZEICHNIS	75
VIII.	DANKSAGUNG	91

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABC	<i>ATP binding cassette</i>
ABPA	allergisch bronchopulmonale Aspergillose
AID	autoinhibitorische Domäne
AIDS	<i>Acquired immune deficiency syndrome</i>
CGD	<i>Chronic granulomatous disease</i>
CT	Computertomographie
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FRAP	<i>Fluorescence recovery after photobleaching</i>
GFP	grün fluoreszierendes Protein
HATPase_c Domäne	<i>Histidine kinase-like ATPase catalytic domain</i>
HHK	Hybrid-Histidin-Kinase
HK	Histidin-Kinase
HOG	<i>High Osmolarity Glycerol</i>
HPt	<i>Histidine-containing Phosphotransfer Protein</i>
IA	invasive Aspergillose
IPA	invasive pulmonale Aspergillose
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein Kinase
MAPKK	Mitogen-aktivierte Protein Kinase Kinase
MAPKKK	Mitogen-aktivierte Protein Kinase Kinase Kinase
MDR	<i>Multi drug resistance</i>
NLS	<i>Nuclear localization sequence</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
RFP	rot fluoreszierendes Protein
sp.	eine Spezies
spp.	mehrere Spezies
TcsC	<i>Two-component system C</i>

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Taxonomische Einordnung von <i>A. fumigatus</i>	3
Abbildung 2: Morphologie und Lebenszyklus von <i>A. fumigatus</i>	5
Abbildung 3: Aufnahme von <i>A. fumigatus</i> Konidien durch Inhalation	6
Abbildung 4: Entwicklung der invasiven Aspergillose (IA) in Abhängigkeit von der Art der Immunsuppression	9
Abbildung 5: Übersicht der wichtigsten durch <i>A. fumigatus</i> ausgelösten Krankheitsbilder im Menschen	10
Abbildung 6: Übersicht über die Gruppen der verfügbaren Antimykotika und deren Wirkung	22
Abbildung 7: Der HOG-Signalweg in <i>A. fumigatus</i>	25
Abbildung 8: Vergleich der Zwei-Komponenten Systeme in Bakterien und in Pilzen	28
Abbildung 9: Die Hybrid-Histidin-Kinase TcsC (<i>Two-component system C</i>) in <i>A.</i> <i>fumigatus</i>	29
Abbildung 10: Modell der negativen Regulation des HOG-Signalwegs durch die Hybrid-Histidin-Kinase Sln1 in <i>S. cerevisiae</i>	58
Abbildung 11: Modell der positiven Regulation des HOG-Signalwegs durch die Hybrid-Histidin-Kinase TcsC in <i>A. fumigatus</i>	59
Abbildung 12: Zusammenhang zwischen der positiven oder negativen Regulation des Kinase-Moduls durch die proximale HAMP-Domäne und der positiven oder negativen Regulation des HOG-Signalwegs	62
Abbildung 13: Regulation der Aktivität von DhNik1 in <i>Debaromyces hansenii</i> unter normal-osmotischen Bedingungen und unter osmotischem Stress	62
Abbildung 14: <i>Nuclear localization sequences</i> (NLS) und die potentielle Transmembrandomäne in TcsC aus <i>A. fumigatus</i>	66
Abbildung 15: Strukturformeln von Fludioxonil, Iprodion und Quintozene	68
Abbildung 16: Screening Assay zur Identifizierung HOG-aktivierender Substanzen	69

I. EINLEITUNG

Mikroorganismen spielen sowohl im Leben des Menschen als auch im Leben der Tiere eine außerordentlich wichtige Rolle. Zum einen als natürlicherweise vorkommende und nützliche Besiedler verschiedener Körperoberflächen, zum anderen aber auch als krankheitsauslösende Faktoren.

Infektionskrankheiten können neben Bakterien, Viren und Parasiten auch durch Pilze ausgelöst werden. Weltweit gibt es schätzungsweise 1,5 Millionen verschiedene Pilzarten (L. HAWKSWORTH, 2002). Pilze sind ein natürlicher Teil unserer Umwelt und besetzen nahezu jeden Lebensraum, von Gewässern bis zum Erdreich (LATGÉ, 1999). Oft jedoch wird ihre Bedeutung als Auslöser schwerer Erkrankungen beim Menschen unterschätzt und die Erforschung pathogener Pilze schreitet langsamer voran als die anderer pathogener Mikroorganismen (BROWN et al., 2012). Pilze gehören zu den Eukaryonten, das heißt, sie unterscheiden sich grundlegend von Bakterien oder Viren. Neben einem echten Zellkern besitzen sie Organellen wie das endoplasmatische Retikulum, den Golgi-Apparat oder Mitochondrien und ähneln daher im Aufbau mehr den Zellen der Säugetiere als denen der Bakterien (GROß, 2013). Nur wenige der bekannten Pilzarten sind in der Lage, Krankheiten auszulösen. Pathogene Pilze sind zumeist opportunistische Erreger, das heißt, eine Infektion von gesunden Menschen findet kaum statt, da der Pilz vom Immunsystem erkannt und eliminiert wird (MCCORMICK et al., 2010). Gefährdet an einer invasiven Mykose zu erkranken sind vor allem immunsupprimierte Patienten, dazu gehören AIDS-Patienten, Patienten nach einer Organ- oder Stammzelltransplantation, Frühgeborene oder Patienten nach Erhalt einer immunsuppressiven Therapie (NUCCI & MARR, 2005). Auslöser einer invasiven Mykose sind zum einen Hefen wie *Candida* spp. und *Cryptococcus* spp. und zum anderen filamentöse Pilze. Klinisch besonders relevant ist die Gattung *Aspergillus*, wobei *Aspergillus fumigatus* die wichtigste Rolle einnimmt (ENOCH et al., 2006). Die Letalitätssrate einer durch *A. fumigatus* ausgelösten invasiven Aspergillose bewegt sich zwischen 40 % und 90 % und ist damit sehr hoch (LIN et al., 2001). Dafür verantwortlich ist die meist späte und schwierig zu stellende Diagnose und die anschließende Therapie, die sich oft schwierig gestaltet und deren Erfolg leider in vielen Fällen unbefriedigend bleibt.

Auch in der Veterinärmedizin spielen Infektionen mit *Aspergillus* eine wichtige

Rolle, sie können in nahezu allen Haussäugetieren, Wildtieren und Vögeln nachgewiesen werden (SEYEDMOUSAVI et al., 2015). Ähnlich wie in der Humanmedizin sind hiervon häufig immunsupprimierte Tiere betroffen, wobei aber auch belastende Umweltbedingungen, Vorerkrankungen eines Tieres oder anatomische Besonderheiten, wie beispielsweise die Luftsäcke der Vögel, zur Entwicklung einer Aspergillose führen können (ZMEILI & SOUBANI, 2007).

Die Anzahl der Antimykotika, welche für eine systemische Behandlung zur Verfügung stehen, ist auf drei Wirkstoffgruppen begrenzt: Polyene, Azole und Echinocandine. Das Polyen Amphotericin B war lange Zeit das Therapeutikum erster Wahl zur Behandlung einer invasiven Aspergillose. Da es aber erhebliche nephrotoxische Eigenschaften zeigt, wurde es mittlerweile durch den Einsatz von Voriconazol aus der Gruppe der Azole als Ersttherapeutikum abgelöst (BATES et al., 2001). In den vergangenen Jahren traten jedoch vermehrt Resistenzen gegen Azole auf (AZEVEDO et al., 2015). Echinocandine, wie Caspofungin, zeichnen sich durch eine gute Wirksamkeit aus und sind auch dadurch interessant, dass sie sich in ihrem Wirkmechanismus von den Polyenen und Azolen deutlich unterscheiden (MARR et al., 2004b).

Insgesamt lässt sich sagen, dass die beschränkte Anzahl der vorhandenen Therapiemöglichkeiten und die Entwicklung von Resistenzen gegen einige dieser Substanzen eine erfolgreiche Behandlung der Aspergillose oft erschweren. Daher ist die Entwicklung neuer Strategien zur Therapie und Bekämpfung der Aspergillose sowohl des Menschen als auch der Tiere dringend erforderlich.

Ein alternativer Ansatz zur Bekämpfung von Aspergillosen und anderen Mykosen wäre die Aktivierung des sogenannten *High Osmolarity Glycerol* (HOG) Signalwegs (SHOR & CHAUHAN, 2015). Der HOG-Signalweg wurde in *Saccharomyces cerevisiae* entdeckt und spielt eine zentrale Rolle in der Aufrechterhaltung des Gleichgewichts im Wasserhaushalt unter hypo- und hyperosmotischen Bedingungen (BAHN, 2008). Eine pharmakologische Aktivierung dieses Signalwegs führt zu einer Störung des osmotischen Gleichgewichts und schädigt den Pilz dadurch massiv (OKADA et al., 2005). Bislang wird diese Strategie jedoch nur in der Landwirtschaft zur Bekämpfung von pflanzenpathogenen Pilzen angewendet (KILANI & FILLINGER, 2016). Ob die Aktivierung des HOG-Signalwegs einen geeigneten Ansatz für die Therapie von Infektionen mit pathogenen Pilzen im Menschen oder im Tier darstellt, ist eine noch offene Frage und erfordert weitere Forschungsarbeit.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. *Aspergillus fumigatus*

1.1. Taxonomie und Bedeutung

1863 wurde die Art *A. fumigatus* erstmals von Johann Baptist Georg Wolfgang Fresenius beschrieben, einem deutschen Arzt und Botaniker aus Frankfurt am Main (SCHMIDT, 1998). Der Begriff „fumigatus“ leitet sich von dem lateinischen Wort „fumus“ ab, was Rauch bedeutet. Der Name entstand durch die grün-graue Färbung der asexuellen Sporen (Konidien) dieses Pilzes und deren rauchartigem Aufwirbeln bei einem Luftzug. Die Gattung *Aspergillus* an sich wurde schon 1729 durch den italienischen Gärtner und Botaniker Pietro Antonio Micheli beschrieben. Er verglich das Aussehen der Sporenträger mit einem Weihwasserwedel (Aspergill) und benannte den Pilz danach. Heute ist auch die Bezeichnung „Gießkannenschimmel“ gebräuchlich.

Lange wurde angenommen, *A. fumigatus* zähle zu den Fungi imperfecti, da zwar bekannt war, dass der Pilz alle nötigen Gene zur sexuellen Vermehrung besitzt, diese aber noch nicht nachgewiesen werden konnten (GROßE & KRAPPMANN, 2008). Im Jahr 2009 wurde schließlich gezeigt, dass sich *A. fumigatus* sowohl vegetativ als auch sexuell vermehren kann und somit wird er in die Klasse der *Ascomycota* eingeordnet (O'GORMAN et al., 2009). Abbildung 1 zeigt die taxonomische Klassifikation von *A. fumigatus*.

Domäne: *Eucaryota*

Reich: *Fungi* (Pilze)

Abteilung: *Ascomycota* (Schlauchpilze)

Klasse: *Ascomycetes* (Echte Schlauchpilze)

Ordnung: *Eurotiales*

Familie: *Trichocomaceae*

Gattung: *Aspergillus* (Gießkannenschimmel)

Hauptarten: *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger*, *A. nidulans*

Abbildung 1: Taxonomische Einordnung von *A. fumigatus*

(G.S. DE HOOG, 2000)

Die Gattung *Aspergillus* umfasst ca. 200 Arten, wovon ca. 40 als pathogen eingestuft werden (KLICH, 2006). Einige dieser Arten sind aufgrund ihrer Primär-

oder Sekundärmetabolite von Interesse für die Industrie. *A. terreus* wird beispielsweise für die Gewinnung von Cyclosporin A, einem Immunsuppressivum und Lovastatin, einem Cholesterinsenker, genutzt (HAJJAJ et al., 2001). *A. niger* dient der Herstellung von Zitronensäure sowie verschiedener Enzyme wie Proteasen, Amylasen, Pektinasen und Phytasen (DAGENAIS & KELLER, 2009). *A. flavus* hingegen kann durch die Produktion von Aflatoxinen großen gesundheitlichen Schaden anrichten und ist deshalb als Lagerpilz in der Landwirtschaft gefürchtet. Das Toxin kann zur Entstehung von Leberkrebs beitragen und führt bei chronischer Exposition zur Immunsuppression (WILLIAMS et al., 2004).

1.2. Morphologie, Lebenszyklus und Habitat von *A. fumigatus*

Der Schimmelpilz *A. fumigatus* zählt zu den Saprophyten, somit ist er nicht in der Lage, Chemo- oder Photosynthese zu betreiben und ernährt sich ausschließlich von totem organischem Material. Das natürliche Habitat dieses Pilzes ist der Erdboden, wo er mit Hilfe einer Vielzahl von sezernierten Enzymen organisches Material zu verwertbaren Makromolekülen abbauen kann. Aufgrund dieser Fähigkeiten kommt *A. fumigatus* beim Recycling von Stickstoff und Kohlenstoff aus sich zersetzender Biomasse eine große Bedeutung zu (LATGÉ, 1999). Als thermotoleranter Organismus erstreckt sich der Temperaturbereich, in welchem *A. fumigatus* wachsen kann, von 30–55 °C, wobei auch bei 70 °C noch ein Überleben des Pilzes möglich ist (ABAD et al., 2010). Die optimale Wachstumstemperatur liegt bei 37 °C (LATGÉ, 1999). Nicht nur die Fähigkeit, unter verschiedensten Umwelt- und Temperaturbedingungen zu bestehen, macht *A. fumigatus* zu einem erfolgreichen Organismus, sondern auch seine äußerst effiziente Art der Verbreitung über Konidien. In jedem Kubikmeter Luft befinden sich 1–100 dieser asexueller Sporen (LATGÉ, 1999), die so über weite Distanzen transportiert werden können. Aufgrund des hohen Trehalosegehaltes, welcher als kompatibles Solut fungiert, sind die 2–3 µm großen Sporen in der Lage, über einen längeren Zeitraum in der Umwelt zu überleben (NI & YU, 2007). Dem Schutz der Konidien vor äußeren Einflüssen dient eine Schicht aus hydrophoben Proteinen, der sogenannten „rodlet layer“. Sie besteht aus den beiden Hydrophobinen RodA und RodB und verhindert die Erkennung durch Makrophagen und andere Phagozyten (AIMANIANDA et al., 2009). Auch ist bekannt, dass die Einlagerung des Pigments Melanin zum Schutz der Sporen vor äußeren Einflüssen wie beispielsweise UV-Licht beiträgt

(LANGFELDER et al., 2003).

Die Auskeimung der Sporen beginnt in Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren, wie Temperatur, pH-Wert, Feuchtigkeitsgehalt und der vorhandenen Kohlenhydrat- und Stickstoffquelle (CARLILE et al., 2001). Zunächst schwillt die Spore durch isotropes Wachstum auf bis zu 5 µm an (ROHDE et al., 2002). Nach wenigen Stunden kommt es zur Ausbildung von Keimschläuchen, die polar in Richtung des terminalen Bereichs wachsen und so eine Hyphe bilden. Durch die Bildung von Septen entstehen innerhalb der Hyphe einzelne Kompartimente, die mehrere Zellkerne besitzen, also coenocytisch sind. Jedes Septum enthält eine Pore, wodurch der Austausch von Zytoplasma und somit die Kommunikation zwischen einzelnen Kompartimenten gewährleistet ist (BLOEMENDAL & KÜCK, 2013). Während des Wachstums der Hyphen kommt es zur Verzweigung und damit zur Bildung von dichtem Myzel. Kommt das Myzel in Kontakt mit Luft, wird die Bildung von neuen Konidien, die Sporulation, induziert. Hierbei fungieren einzelne Zellen des Myzels als Fußzelle, von der aus senkrecht zur Längsachse ein Konidiophor emporwächst. Am Ende des Konidiophors entsteht ein birnenförmiges Konidiophorenvesikel, woraus sich die konidienbildenden Phialiden als längliche Strukturen ausstülpen, von denen sich wiederum die Konidien abschnüren und lange Ketten bilden (RAPER, 1965). Die Konidien werden anschließend über die Luft verbreitet und der Lebenszyklus von *A. fumigatus* beginnt von vorne (Abbildung 2).

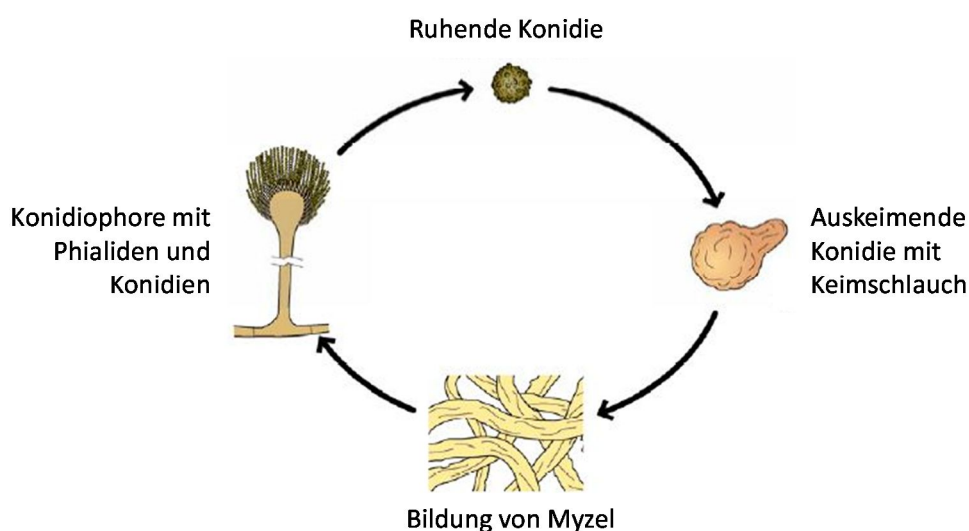


Abbildung 2: Morphologie und Lebenszyklus von *A. fumigatus*
(SCHWIENBACHER, 2005)

2. Bedeutung in der Humanmedizin

Aufgrund der Allgegenwärtigkeit von *A. fumigatus*, beispielsweise in der Raumluft oder der Erde, ist der Mensch einem ständigen Kontakt mit den Konidien dieses Schimmelpilzes ausgesetzt. Obwohl deshalb jeder Mensch täglich mehrere hundert Konidien einatmet (LATGÉ, 1999), kommen Infektionen mit *A. fumigatus* bei gesunden und immunkompetenten Personen in der Regel nicht vor. Die Aufnahme der Konidien durch Inhalation ist in Abbildung 3 dargestellt. Gelangen Konidien durch Inhalation in die Lunge des Menschen, sind sie aufgrund ihrer geringen Größe von 2–3 μm in der Lage, das Flimmerepithel und damit die mukoziliäre Clearance zu überwinden und bis in die Alveolen der Lunge vorzudringen. Auch kann die Bildung von Gliotoxin die Frequenz des Zilienschlags des respiratorischen Epithels reduzieren und somit zu einer Schwächung der mukoziliären Clearance führen (AMITANI et al., 1995). In den Alveolen der Lunge angelangt, treffen die Konidien auf Alveolarmakrophagen, die einerseits zur Phagozytose der Konidien fähig sind und andererseits verschiedene Zytokine und Chemokine abgeben können, was zur Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten führen kann. Die damit ausgelöste lokale Entzündungsreaktion führt in der Regel zu einer effizienten Eliminierung der eingedrungenen Konidien (DAGENAIS & KELLER, 2009).

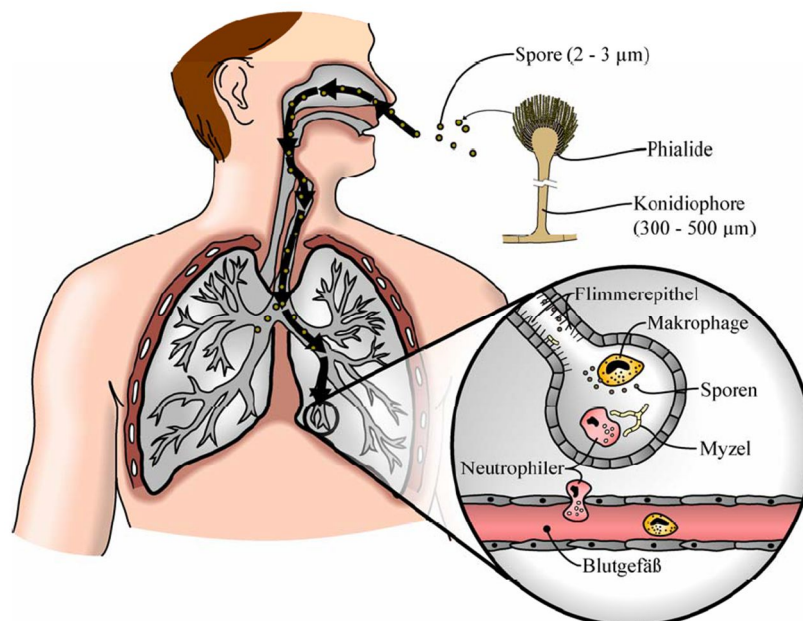


Abbildung 3: Aufnahme von *A. fumigatus* Konidien durch Inhalation
(SCHWIENBACHER, 2005)

Allergische Reaktionen, wie bronchiales Asthma, allergische Sinusitis oder

Alveolitis, sind in der Regel die Folge einer ständigen oder wiederholten Exposition gegenüber *A. fumigatus* Konidien. Diese Erkrankungen gehen nicht mit der Bildung von Myzel innerhalb des Patienten einher, es kommt also nicht zur Infektion. In vielen Fällen führt schon die Senkung der Sporenbelastung zu einer Besserung der klinischen Symptomatik (LATGÉ, 1999).

Ist hingegen die Abwehrleistung eines Menschen beeinträchtigt, läuft er Gefahr, an einer Infektion mit *A. fumigatus* zu erkranken, die schwerwiegend verlaufen kann. Bei der Infektion des Wirtes unterscheidet man zwischen nicht invasiven Erkrankungen, wie dem Aspergillom (Pilzball) und der allergisch bronchopulmonalen Aspergillose (ABPA), und den invasiven Erkrankungen, wie der invasiven pulmonalen Aspergillose (IPA) oder extrapulmonalen Manifestationen wie beispielsweise Keratitis, Otitis oder Sinusitis (RUCHEL & REICHARD, 1999).

2.1. Die allergisch bronchopulmonale Aspergillose (ABPA)

Die allergisch bronchopulmonale Aspergillose ist eine der schwerwiegendsten allergisch pulmonalen Erkrankungen. Sie entsteht durch eine Immunreaktion auf Antigene von *A. fumigatus*. Es liegt hierbei eine oberflächliche Kolonisierung des Lumens der Bronchien vor (VAUGHAN, 1993). Sie betrifft vor allem Patienten, die an Asthma oder cystischer Fibrose leiden, wobei etwa 1–2 % der Asthmapatienten (SCHWARTZ & GREENBERGER, 1991) und 3–25 % der Patienten mit cystischer Fibrose betroffen sind (MATURU & AGARWAL, 2015). Klinisch manifestiert sich die ABPA als bronchiales Asthma mit transienten Lungeninfiltraten, die zu Bronchiektasien und schließlich zur Lungenfibrose führen können (WARDLAW & GEDDES, 1992). Neben den Symptomen des Asthmas zeigen Patienten außerdem Thoraxschmerzen, Hämoptysen und Myalgien. Um die ABPA zu diagnostizieren, können die Rosenberg-Patterson Kriterien angewendet werden. Zu den essentiellen Kriterien gehören das Vorhandensein des bronchialen Asthmas, eine positive Hautreaktion auf injizierte *Aspergillus*-Antigene, eine Erhöhung des Gesamt-IgE-Gehalts im Serum, eine Erhöhung spezifischer IgE und IgG gegen *Aspergillus*-Antigene und zentrale Bronchiektasien (ROSENBERG et al., 1977)

2.2. Das Aspergillom (Pilzball)

In den 1950er Jahren war das Aspergillom die klassische Form der Aspergillose,

heute kommt es bei 10–15 % der höhlenbildenden Lungenkrankheiten vor (ADDRIZZO-HARRIS et al., 1997). Das Aspergillom tritt nur in bereits bestehenden Hohlräumen der Lunge auf, wie sie zum Beispiel bei Tuberkulose, Sarkoidose oder anderen bullösen Lungenerkrankungen vorkommen. Nachdem die inhalierten Konidien ausgekeimt sind, kommt es zu einem kugelförmigen, in der Regel nicht invasiven Wachstum der Hyphen innerhalb des zur Verfügung stehenden Hohlraums. Die Hyphen des Aspergilloms sind in einer proteinartigen Matrix eingebettet, in deren Peripherie es auch zur Sporulation kommt (LATGÉ, 1999). Oft zeigen Patienten mit Aspergillom keine Symptome, es kann aber in seltenen Fällen durch das Eindringen der Hyphen in die Bronchialarterien zu lebensbedrohlichen Hämoptysen kommen (CHOTIRMALL et al., 2013). Die Diagnose wird meist als Zufallsbefund in einer Röntgenaufnahme oder einer Computertomographie (CT) der Lunge gestellt. Das Aspergillom kann chirurgisch entfernt werden, diese Therapiemöglichkeit sollte jedoch Patienten mit schwerer Hämoptyse vorbehalten sein, da es zu ernststen postoperativen Komplikationen wie Blutungen und bronchopleuralen Fisteln kommen kann. Neben der oralen Therapie mit Antimykotika können diese auch CT-gesteuert direkt in das Aspergillom injiziert werden, was eine vielversprechende Alternative zur chirurgischen Sanierung darstellt (STEVENS et al., 2000).

2.3. Die invasive Aspergillose (IA)

Die invasive Aspergillose gilt als die schwerste Erkrankung die mit *A. fumigatus* in Verbindung gebracht wird und betrifft fast ausschließlich immunsupprimierte Patienten. Dazu gehören Patienten mit hämatologischen Neoplasien wie Leukämie, Patienten nach Organ- oder Stammzelltransplantation, Patienten unter langanhaltender Corticosteroidgabe und AIDS Patienten (DAGENAIS & KELLER, 2009). Außerdem sind Patienten, die an chronischer Granulomatose (*chronic granulomatous disease*, CGD) leiden, oft empfänglicher für Pilzinfektionen, da die Funktion der Phagozyten durch einen genetischen Defekt in der NADPH-Oxidase beeinträchtigt ist (LEIDING & HOLLAND, 1993). Die Mortalität der invasiven Aspergillose bewegt sich zwischen 40 % und 90 %, abhängig vom Immunstatus des Patienten, dem Infektionsort und der eingeleiteten Therapie (LIN et al., 2001). Verantwortlich für das erhöhte Risiko dieser Patienten, an einer invasiven Aspergillose zu erkranken, sind zum einen eine Neutropenie, also eine verringerte Anzahl an neutrophilen Granulozyten im Blut, und zum

anderen eine durch Corticosteroide verursachte Immunsuppression. Abhängig davon, welche der genannten Arten einer Immunsuppression vorliegt, unterscheiden sich auch die pathologischen Konsequenzen im Verlauf der Erkrankung (BERENGUER et al., 1995). Dies ist in Abbildung 4 dargestellt.

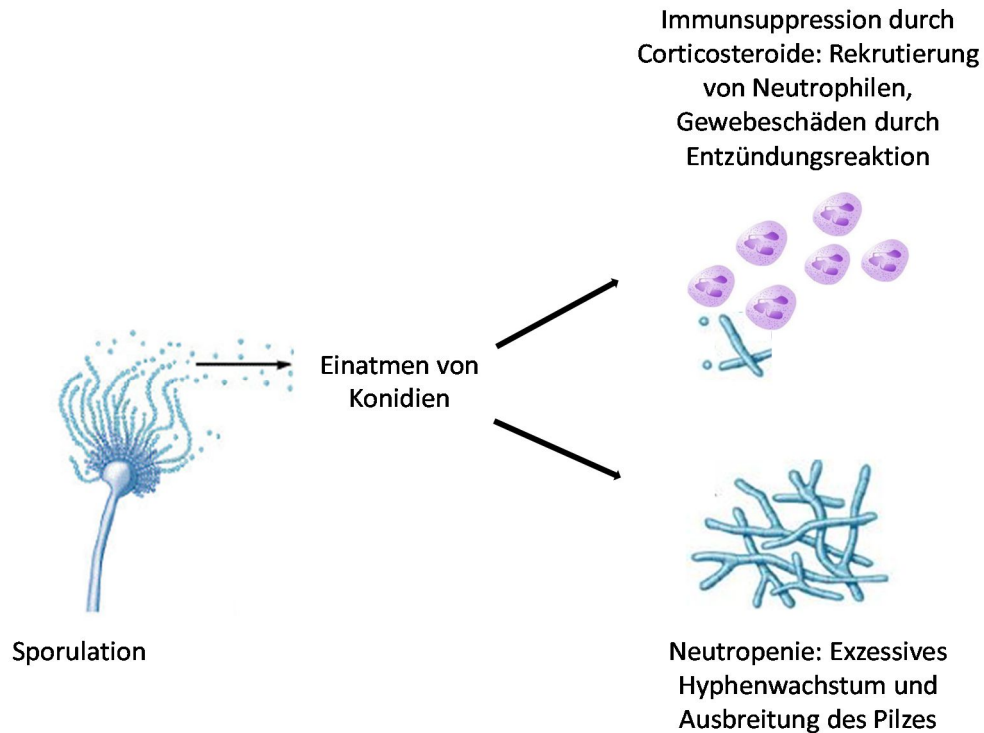


Abbildung 4: Entwicklung der invasiven Aspergillose (IA) in Abhängigkeit von der Art der Immunsuppression

Modifiziert nach Dagenais und Keller, 2009 (DAGENAIS & KELLER, 2009)

Eine Neutropenie entsteht meist, wenn Patienten über einen längeren Zeitraum mit Cyclophosphamid, einem Zytostatikum, behandelt werden. Dabei interkaliert der Wirkstoff in die DNA, stört dadurch die Replikation und führt zur Depletion von weißen Blutzellen, einschließlich der neutrophilen Granulozyten. Die Folge ist eine stark abgeschwächte Entzündungsreaktion auf eine Infektion. Es kommt zu einem schnellen und massiven Hyphenwachstum mit Angioinvasion und Dissemination in andere Organe. Daraus resultieren Thrombosen und Blutungen, die bis zum Tod führen können (DAGENAIS & KELLER, 2009). In Patienten, die Corticosteroide erhalten, nimmt die invasive Aspergillose pathologisch gesehen einen völlig anderen, nicht-angioinvasiven Verlauf. Glucocorticoide beeinträchtigen das Immunsystem auf vielfältige Weise, jedoch werden weiterhin neutrophile Granulozyten rekrutiert (DAGENAIS & KELLER, 2009). Die Erkrankung ist hier nicht durch unkontrolliertes Hyphenwachstum gekennzeichnet, sondern durch die

Entstehung von pyogranulomatösen Infiltraten, Gewebnekrosen und einer massiven Entzündungsreaktion durch die einwandernden Neutrophilen. Das Gewebe kann dabei so stark geschädigt werden, dass keine Heilung mehr möglich ist und es zum Tod des Patienten kommt (DAGENAIS & KELLER, 2009).

Es können vier verschiedene Formen der invasiven Aspergillose unterschieden werden: Die akute oder chronische invasive pulmonale Aspergillose (IPA), welche die am häufigsten vorkommende Form darstellt, die Tracheobronchitis oder obstruktive Bronchitis, die akute invasive Rhinosinusitis und die disseminierte Form der IA mit Gehirn- oder anderer Organbeteiligung (DENNING, 1998). Die Symptome der IA sind oft unspezifisch. Dazu gehören Brustschmerz, Hämoptysen, Dyspnoe, trockener Husten und Fieber. Entwickelt sich eine disseminierte Form der IA, die zum Beispiel durch hämatogene Streuung des Erregers verschiedene Organe und insbesondere das Gehirn betreffen kann, steigen die Mortalitätsraten auch bei adäquater antifungaler Therapie auf bis zu 90 % an (THOMPSON & PATTERSON, 2008). Die wichtigsten Krankheitsbilder, die *A. fumigatus* im Menschen auslösen kann, sind in Abbildung 5 zusammengefasst.

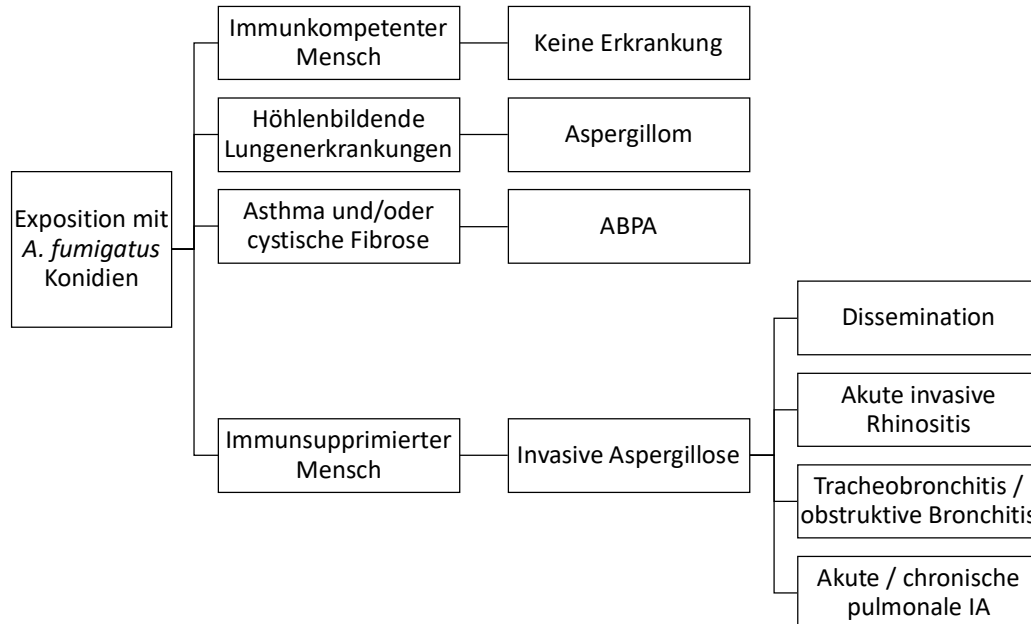


Abbildung 5: Übersicht der wichtigsten durch *A. fumigatus* ausgelösten Krankheitsbilder im Menschen

(BECK, 2014)

3. Bedeutung in der Veterinärmedizin

In nahezu allen Haussäugetieren, Wildtieren und Vögeln können Infektionen mit *Aspergillus* nachgewiesen werden und verursachen ein breites Spektrum von Krankheitsbildern. Diese reichen von allergischen Reaktionen auf inhalierte Konidien über lokale Infektionen bis hin zu systemischen Aspergillosen (SEYEDMOUSAVI et al., 2015). Prädisponierend für die Entwicklung einer Aspergillose ist, ähnlich wie in der Humanmedizin, zumeist eine eingeschränkte Funktionsfähigkeit des Immunsystems. Es können aber auch gesunde Tiere betroffen sein, die immunsupprimierenden Umweltbedingungen ausgesetzt sind oder an einer Vorerkrankung leiden. Beispielsweise ist bekannt, dass Tuberkulose als Grunderkrankung eine wichtige Rolle bei der Entstehung einer Aspergillose spielen kann (ZMEILI & SOUBANI, 2007). Die häufigsten Formen der Aspergillose sind pulmonale Infektionen bei Geflügel und anderen Vögeln, Abort und Mastitis beim Rind, Luftsackmykosen beim Pferd, sinonasale Infektionen bei Hund und Katze, sowie mit Pneumonien assoziierte disseminierte Infektionen in Meeressäugern (SEYEDMOUSAVI et al., 2015).

3.1. Die Aspergillose des Geflügels und anderer Vögel

A. fumigatus gilt als einer der häufigsten Auslöser respiratorischer Erkrankungen beim Vogel (BEERNAERT et al., 2010). Der Grund hierfür scheint zu sein, dass *A. fumigatus* kleinere Sporen besitzt als andere Spezies wie *A. flavus*, *A. niger* oder *A. terreus* und daher tief in den Respirationstrakt eintreten kann (RICHARD & THURSTON, 1983). Außerdem kann die Beeinträchtigung der mukoziliären Clearance durch die Bildung von Gliotoxin das Eindringen der Konidien in die Alveolen der Lunge erleichtern (AMITANI et al., 1995). Prädisponierend für die Entwicklung einer Aspergillose beim Vogel ist eine erhöhte Sporenkonzentration in der Umwelt. Auslöser hierfür sind vielfältig, wie beispielsweise eine warme und feuchte Umgebung mit schlechter Belüftung, schlechte Hygienebedingungen oder über lange Zeit gelagertes Futter (BEERNAERT et al., 2010). Ebenso kann ein geschwächtes Immunsystem durch längerfristige Gabe von Glucocorticoiden, Antibiotika, falsche Ernährung, die zu einer Hypovitaminose A führt, oder Überbelegung des Stalls prädisponierend für eine Aspergillose sein (BEERNAERT et al., 2010). Infektionen beginnen meist mit der Inhalation von Konidien und betreffen in der Regel zuerst die Luftsäcke (NARDONI et al., 2006). Die Luftsäcke führen die Luft wie Blasebälge durch die Lunge, kommen also zuerst mit der

eingeatmeten Luft in Kontakt. Im Gegensatz zur Lunge der Säugetiere, ist der Respirationstrakt des Vogels nur mit wenigen residenten Makrophagen besetzt (BROWN et al., 1997). Darüber hinaus ist die mukoziliäre Clearance weitaus schlechter ausgebildet (MAINA, 2006). Dies führt zu einer geringeren Elimination der eingedrungenen Konidien. Wenn eine erhöhte Sporenbelastung oder eine Immunsuppression vorliegt, kann es zur Entstehung von lose aufliegenden Plaques kommen, welche zu einer Obstruktion der Trachea führen oder die Luftsäcke ausfüllen können (BEERNAERT et al., 2010). Weiterhin können die Luftsäcke durch das Hyphenwachstum penetriert werden, was zu einer Serositis oder oberflächlichen Nekrosen der umgebenden Organe führen kann (TSAI et al., 1992). Neben dieser lokalen Infektionen kann es zu disseminierten Aspergillosen durch hämatogene Streuung kommen (BEERNAERT et al., 2010).

Wie sich die Aspergillose des Vogels manifestiert, hängt von der Infektionsdosis, der Verteilung der Sporen, möglichen Vorerkrankungen und dem Immunstatus des Vogels ab. Es können drei Krankheitsverläufe unterschieden werden (SEYEDMOUSAVI et al., 2015):

- Die akute Aspergillose
- Die chronische Aspergillose
- Die Mykotoxikose

Die akute Aspergillose betrifft meist junge Vögel und ist durch eine hohe Morbidität und Mortalität gekennzeichnet. Sie entsteht durch die Inhalation einer großen Menge an Konidien und zeigt in der Regel unspezifische Symptome wie zum Beispiel Anorexie, Lethargie, Kümern, Bewegungsstörungen, Dyspnoe, Polyurie, Polydipsie und plötzliche Todesfälle (SEYEDMOUSAVI et al., 2015). Werden Küken während des Schlüpfens infiziert, verläuft die Aspergillose meist tödlich innerhalb der ersten zehn Lebenstage (HAMET et al., 1991). Beim älteren Geflügel umfassen die respiratorischen Symptome auch Schnabelatmung, Zyanosen, Schwanzwippen oder Pfeifgeräusche (SEYEDMOUSAVI et al., 2015).

Die chronische Aspergillose wird mit einer Immunsuppression des Wirts in Zusammenhang gebracht, die meist durch schlechte Haltungsbedingungen entsteht. Sie tritt nur sporadisch auf und betrifft vor allem ältere Tiere, die zur Zucht eingesetzt werden (SEYEDMOUSAVI et al., 2015). Die vorherrschenden Symptome sind unspezifisch, wie zum Beispiel reduziertes Allgemeinbefinden,

Gewichtsverlust und verminderte Belastbarkeit verbunden mit Dyspnoe. Es kann aber auch zu einer Beteiligung des Nervensystems kommen, was zu Ataxien, Tortikollis, Opisthotonus, Paresen der Beine und in manchen Fällen zur Erblindung führt (SEYEDMOUSAVI et al., 2015). Des Weiteren kann eine chronische Infektion mit *A. fumigatus* zu Blepharitis, Keratitis und Keratokonjunktivitis führen (BECKMAN et al., 1994). Außerdem ist *A. fumigatus* in der Lage, die Haut und oberflächliche Wunden zu kolonisieren (MOHAMMED et al., 1980).

Die Aufnahme toxischer Metaboliten über das Futter kann bei Vögeln zur Mykotoxikose führen (SEYEDMOUSAVI et al., 2015). *A. fumigatus* ist in der Lage, in der Lunge des Wirts signifikante Mengen an Gliotoxin zu produzieren (RICHARD et al., 1996). Da Gliotoxin die Funktion von Phagozyten beeinträchtigt, besitzt es immunsupprimierende Eigenschaften und kann so zur Entwicklung einer Aspergillose beitragen (SCHLAM et al., 2016). Neben Gliotoxin spielt Aflatoxin eine wichtige Rolle, welches zwar nicht von *A. fumigatus*, aber von anderen *Aspergillus* Spezies insbesondere *A. flavus*, gebildet wird. Die Aufnahme von Aflatoxin kann zu schweren Nieren- und Leberschäden und dadurch zum Tod führen (SEYEDMOUSAVI et al., 2015).

3.2. Die Aspergillose der Wiederkäuer

A. fumigatus ist in Heu und Silage weit verbreitet (COLE et al., 1977). Gesunde Rinder mit aktivem Immunsystem sind in der Regel resistent gegen opportunistische Infektionen, jedoch können Milchkühe in der frühen Laktation empfänglich sein. *Aspergillus* Spezies, insbesondere *A. fumigatus*, können in Wiederkäuern, vor allem in Rindern, verschiedene Krankheitsbilder auslösen (SEYEDMOUSAVI et al., 2015):

- Mykotische Pneumonie
- Gastrointestinale Aspergillose
- Mykotische Mastitis
- Mykotische Plazentitis und Abort
- Mykotoxikose

Die mykotische Pneumonie nimmt meist einen schnellen und schweren Verlauf und geht mit Fieber, Nasenausfluss, feuchtem Husten, flacher und röchelnder Atmung einher (SEYEDMOUSAVI et al., 2015). Die Lunge enthält multiple Granulome, die an Tuberkulose erinnern (MUNTZ, 1999). Histologisch sind neben Hyphen

auch Oxalatkristalle sichtbar, die von verschiedenen *Aspergillus* Spezies produziert werden können (MUNTZ, 1999). Oxalsäure übt einen toxischen Effekt auf Gewebe aus und kann zu Nekrosen führen. Die Oxalatkristalle können zu schweren lokalen Gewebeschäden und somit zu starken Blutungen führen (LEE et al., 1986).

Von der gastrointestinalen Aspergillose ist fast ausschließlich der Blättermagen betroffen, gefolgt von Pansen und Netzmagen (JENSEN et al., 1994). Oft wurden betroffene Rinder zuvor intensiv mit Breitspektrum-Antibiotika behandelt und zeigen eine verminderte Kontraktionsfähigkeit des Blättermagens, Durchfall und Meläna (SEYEDMOUSAVI et al., 2015). Es konnte gezeigt werden, dass die mykotische Pneumonie und Plazentitis Sekundärinfektionen nach einer gastrointestinalen Aspergillose sein können, sofern eine hämatogene Streuung erfolgte (SARFATI et al., 1996).

Milchschafe sind häufiger von mykotischen Mastitiden betroffen als Rinder (PEREZ et al., 1998). Durch *A. fumigatus* ausgelöste Fälle von Mastitis treten beim Schaf sporadisch auf, insbesondere wenn Antibiotika vor der Geburt eingesetzt wurden (LAS HERAS et al., 2000).

Eine Infektion mit *Aspergillus* Spezies ist ein häufiger Grund für eine Plazentitis beim Rind und Auslöser von Aborten, die meist im dritten Trimester der Trächtigkeit vorkommen (KNUDTSON & KIRKBRIDE, 1992). Ist eine Herde einer hohen Belastung von *Aspergillus* Konidien ausgesetzt, können Aborte gleichzeitig bei mehreren Tieren beobachtet werden. Die Plazentitis wird durch die hämatogene Verbreitung von *Aspergillus* im ganzen Körper ausgelöst, die Tiere zeigen jedoch keine klinischen Symptome und auch die nachfolgenden Trächtigkeiten verlaufen in der Regel wieder unproblematisch (KNUDTSON & KIRKBRIDE, 1992).

Mykotoxine wie Gliotoxin kommen in Silage vor und können so von Wiederkäuern aufgenommen werden (COLE et al., 1977). Betroffene Rinder zeigen Symptome wie vermindertes Allgemeinbefinden, Abmagerung, Durchfall, abnormales Verhalten und vereinzelt Todesfälle (COLE et al., 1977). Beim kleinen Wiederkäuer werden vermindertes Wachstum und histopathologische Veränderung in Leber und Niere beobachtet. Außerdem wurde gezeigt, dass Gliotoxin die Fermentationsfähigkeit des Pansens und damit die Futterverdaulichkeit reduzieren kann (MORGAVI et al., 2004).

3.3. Die Aspergillose des Pferdes

Bei Pferden verursacht *Aspergillus* in erster Linie die zwei folgenden Krankheitsbilder (DOBESOVA et al., 2012):

- Luftsackmykosen
- Pneumonien

Die equine Aspergillose ist zwar eine selten vorkommende, aber lebensbedrohliche Erkrankung (GUILLOT et al., 1997). Prädisponierend für die Entwicklung einer Aspergillose sind das Vorliegen einer Enteritis (HATTEL et al., 1991), langanhaltende Antibiotikatherapie, Immunsuppression, Endokrinopathien und Neoplasien (CARRASCO et al., 1996). Typisch für eine Luftsackmykose sind klar abgrenzbare, gelb-braune nekrotisierende Läsionen, die fest mit dem Gewebe der medialen Bucht des Luftsacks verbunden sind (COOK, 1966). So lange die darunterliegenden Gefäße und Nerven nicht in Mitleidenschaft gezogen sind, verläuft die Luftsackmykose asymptomatisch. Kommt es aber zu Erosionen der *Arteria carotis* oder der *Arteria maxillaris*, kann es zu starkem, plötzlich auftretenden Nasenbluten kommen, welches innerhalb weniger Tage in 34–60 % der Fälle zum Tod des Tieres durch Verbluten führt (SEYEDMOUSAVI et al., 2015). Entsteht im Verlauf der Luftsackmykose eine Entzündung der kranialen Nerven, entwickeln sich Dysphagien mit Nasenausfluss, Kehlkopfpfeifen, Fazialisparesen oder ein Horner-Syndrom (SEYEDMOUSAVI et al., 2015).

Die pulmonale Aspergillose des Pferdes verursacht milde respiratorische Symptome wie Tachypnoe, Fieber und gelegentlich Atemgeräusche. Da diese Erkrankung nicht leicht zu diagnostizieren ist, sollten bei respiratorischen Problemen immer auch die Haltungsbedingungen des Pferdes berücksichtigt werden, die eventuell die Entwicklung einer Aspergillose begünstigen können (SWEENEY & HABECKER, 1999).

Neben diesen beiden Haupterkrankungen, die durch *Aspergillus* Spezies verursacht werden, kann es auch zur eher ungewöhnlichen nasalen Aspergillose oder zur Keratomykose kommen (SEYEDMOUSAVI et al., 2015). Die Symptome der nasalen Aspergillose können stark variieren, charakteristisch sind Dyspnoe und Nasenausfluss (KENDALL et al., 2008). Die Keratomykose kommt besonders in warmen Klimazonen vor. In leichten Fällen führt sie zu punktförmigen Hornhautläsionen, bei schweren Verläufen können aber auch einschmelzende Ulzera oder Abszesse entstehen (SANSOM et al., 2005). Klinisch zeigen die

betroffenen Pferde Blepharospasmus, Photophobie und Augenausfluss. Begünstigend für die Entwicklung der Keratomykose ist eine langfristige topische Applikation von Antibiotika, welche die Flora der Konjunktiven verändert oder die Gabe von Glucocorticoiden (SEYEDMOUSAVI et al., 2015).

3.4. Die Aspergillose bei Hund und Katze

Die drei häufigsten Formen der Aspergillose des Hundes sind (SEYEDMOUSAVI et al., 2015):

- Die sinonasale Mykose
- Die bronchopulmonale Aspergillose
- Disseminierte Infektionen

Die sinonasale Mykose ist die häufigste Form der Aspergillose beim Hund und kommt vorrangig bei dolichocephalen und mesozephalen Rassen vor, wobei der Deutsche Schäferhund und der Rottweiler am häufigsten betroffen sind (SEYEDMOUSAVI et al., 2015). Nach nasalen Neoplasien, ist die sinonasale Mykose die zweithäufigste Ursache für chronischen Nasenausfluss beim Hund (TASKER et al., 1999). Am häufigsten wird *A. fumigatus* aus Patienten isoliert, aber auch andere Spezies wie *A. niger*, *A. flavus* oder *A. nidulans* werden gefunden (TALBOT et al., 2014). Klinische Symptome für die sinonasale Mykose sind Schmerzen am Nasenrücken, Ulzerationen des Nasenspiegels oder bilaterales Nasenbluten (PEETERS & CLERCX, 2007).

Die bronchopulmonale Aspergillose des Hundes kommt selten vor und präsentiert sich mit unspezifischen Symptomen wie Fieber, Husten und reduziertem Allgemeinbefinden (ADAMAMA-MORAITOU et al., 2011). Meist zeigt sich bei einer Bronchoalveolarlavage eine unspezifische Entzündungsreaktion, dominiert von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen, während Bestandteile des Pilzes nur selten zu sehen sind (BILLEN et al., 2009).

Die disseminierte Form der Aspergillose kommt nur selten vor, kann aber tödlich verlaufen und wird vor allem beim Deutschen Schäferhund beobachtet (SEYEDMOUSAVI et al., 2015). Meist entsteht die disseminierte Aspergillose durch eine Infektion mit *A. terreus* oder *A. deflexus*. *A. fumigatus* spielt hierbei nur eine untergeordnete Rolle (SCHULTZ et al., 2008). Klinisch zeigen die betroffenen Hunde Symptome wie Lethargie, Anorexie, Fieber, Lahmheit, Gewichtsverlust, Inkontinenz und neurologische Ausfälle (SEYEDMOUSAVI et al., 2015).

Bei der Katze kommen zwei Formen der Aspergillose vor (SEYEDMOUSAVI et al., 2015):

- Die sinonasale Mykose
- Die sinoorbitale Mykose

Die sinoorbitale Aspergillose entwickelt sich in der Regel durch ein Fortschreiten der sinonasalen Aspergillose. Ihr Vorkommen wird immer häufiger beobachtet, ein Grund hierfür könnte eine virusinduzierte Immunsuppression sein (BARACHETTI et al., 2009). Die Mykose breitet sich bei betroffenen Katzen in den periorbitalen Bereich aus, was die Behandlung erschwert und zu einer schlechten Prognose führt (BARRS & TALBOT, 2014). Der häufigste Auslöser einer sinoorbitalen Mykose bei der Katze ist *A. felis*, die sinonasale Form wird dagegen meist von *A. fumigatus* verursacht und hat eine bessere Prognose, da sie leichter zu behandeln ist (SEYEDMOUSAVI et al., 2015).

3.5. Die Aspergillose der Meeressäuger

Obwohl die Aspergillose bei Meeressäugern selten ist, wird immer häufiger von entsprechenden Fällen berichtet (DAGLEISH et al., 2008). *Aspergillus* Spezies können in Meeressäugern sowohl Primär- als auch Sekundärinfektionen verursachen, wobei Primärinfektionen zu den tödlich verlaufenden Erkrankungen dieser Tiere zählen. Sekundärinfektionen entstehen in Folge eines anderen chronisch infektiösen Prozesses und sind ein Hinweis auf eine zugrundeliegende Immunsuppression (ABDO et al., 2012). Bei Walen konnte in einigen Fällen eine pulmonale Aspergillose festgestellt werden, die am häufigsten von *A. fumigatus* ausgelöst wurde, weniger häufig von *A. niger* oder *A. terreus*. Neben der Lunge können aber auch andere Organe betroffen sein, beispielsweise wurde eine mykotische Enzephalitis mit gastrointestinaler Beteiligung bei einem gestrandeten Nördlichen Entenwal nachgewiesen, wobei *A. fumigatus* isoliert werden konnte (DAGLEISH et al., 2008).

4. Methoden für die Diagnostik von Aspergillosen

4.1. Diagnostische Methoden in der Humanmedizin

Obwohl eine Reihe antifungaler Therapeutika zur Verfügung stehen, ist die Überlebensrate bei Patienten mit invasiver Aspergillose niedrig. Ein Grund hierfür ist eine oft zu spät gestellte Diagnose (WHEAT, 2006). Für die Diagnostik von invasiven Aspergillosen gibt es internationale Kriterien (DE PAUW et al., 2008). Sie basiert auf klinischen Symptomen des Patienten, radiologischen Veränderungen, histopathologischen Daten, dem kulturellen Erregernachweis und dem serologischen Nachweis von Zellwandbestandteilen des Pilzes wie Galaktomannan (OSTROSKY-ZEICHNER, 2012).

Die Symptome der invasiven Aspergillose sind oft unspezifisch und wenig ausgeprägt. Betroffene Patienten zeigen beispielsweise Husten, Fieber oder Brustschmerzen (SHERIF & SEGAL, 2010). Röntgenaufnahmen des Thorax erlauben meist keine eindeutige Diagnose. Außerdem treten Veränderungen durch die invasive Aspergillose erst relativ spät auf, sodass auch aus diesem Grund Röntgenaufnahmen für eine frühzeitige Diagnostik ungeeignet sind (BARNES & MARR, 2007). Die Computertomographie ist dagegen besser geeignet und ein wichtiges Instrument zur frühen Erkennung der Aspergillose. Hinweisend kann das sogenannte Halo-Zeichen beziehungsweise das umgekehrte Halo-Zeichen sein (OSTROSKY-ZEICHNER, 2012). Als Halo-Zeichen bezeichnet man eine milchglasartige Trübung um eine noduläre Masse in der Lunge. Beim umgekehrten Halo-Zeichen findet man eine rundliche, milchglasartig getrübbte Masse, die von einem sichelförmigen bis vollständigen Ring umgeben wird (GEORGIADOU et al., 2011). Diese Zeichen sind aber nicht spezifisch für eine Aspergillose, weshalb die Computertomographie insgesamt zwar als sensitiv, aber wenig spezifisch beschrieben wird (OSTROSKY-ZEICHNER, 2012).

Die Histologie ist eine geeignete Methode um Pilzinfektionen nachzuweisen, es ist aber hierbei oft schwer, *Aspergillus* Spezies von anderen filamentösen Pilzen zu unterscheiden (OSTROSKY-ZEICHNER, 2012). Außerdem ist es in vielen Fällen nicht möglich, eine Biopsie durchzuführen, da neutropenische Patienten dazu neigen, auch eine Thrombozytopenie zu zeigen, was das Risiko für Blutungen während eines invasiven Eingriffs stark steigen lässt (BARNES & MARR, 2007).

Kulturen aus einer Bronchoalveolarlavage oder aus Sputum können hilfreich für die Diagnosestellung und für die Speziesidentifizierung sein, sie sind jedoch oft

falsch negativ und vor allem bei Kulturen aus Sputum kann es sich um Kontaminationen oder um eine normale Kolonisierung handeln. Ergebnisse solcher Kulturen sind umso relevanter und aussagekräftiger, je stärker die Immunsuppression des Patienten ausgeprägt ist (OSTROSKY-ZEICHNER, 2012). Blutkulturen sind in den meisten Fällen negativ, auch wenn der Erreger schon weit im Körper verbreitet ist (OSTROSKY-ZEICHNER, 2012).

Galaktomannan ist eine Komponente der Zellwand von *Aspergillus* und wird während des Wachstums oder während der Gewebsinvasion in die Umgebung freigesetzt (BARNES & MARR, 2007). Die Menge an Galaktomannan im Serum korreliert mit der Pilzbürde des Patienten, deshalb ist der Nachweis dieses Antigens zur Diagnostik einer Aspergillose geeignet (MARR et al., 2004a). Seit 2003 steht für den Nachweis einer *Aspergillus*-Infektion in adulten Patienten ein kommerziell erhältlicher Galaktomannan-Assay zur Verfügung (Platelia™ *Aspergillus* Galactomannan EIA, Bio-Rad Laboratories, Inc.). Es handelt sich hierbei um einen Sandwich-ELISA (OSTROSKY-ZEICHNER, 2012). Dieser Galaktomannan-Assay hat sowohl Vor- als auch Nachteile. Er ist gut standardisiert und benutzerfreundlich, seine Sensitivität und Spezifität sind hoch (PFEIFFER et al., 2006), jedoch kann es zu falsch positiven Ergebnissen beim Einsatz von beta-Lactam Antibiotika kommen. Außerdem wurde beobachtet, dass es beim Galaktomannan-Assay zu Kreuzreaktivitäten mit *Fusarium*-Infektionen kommen kann (NUCCI et al., 2014; WIEDEMANN et al., 2016a). Falsch negative Ergebnisse können durch eine zuvor durchgeführte antifungale Therapie entstehen oder durch eine nur sehr niedrige Pilzbürde des Patienten (BARNES & MARR, 2007).

Im Allgemeinen sind molekularbiologische Methoden ein gut geeignetes Werkzeug, um Infektionskrankheiten mit hoher Sensitivität nachzuweisen, außerdem liefert die PCR-basierte Diagnostik schnellere Ergebnisse als der kulturelle Erregernachweis oder die Histologie (OSTROSKY-ZEICHNER, 2012). Derzeit sorgt die fehlende Standardisierung der PCR-Protokolle aber dafür, dass diese Methode noch nicht zur Standard-Diagnostik für Pilzerkrankungen gehört (DE PAUW et al., 2008). Zudem kann die hohe Sensitivität zu falsch positiven Ergebnissen führen. Zurzeit wird daher empfohlen, die PCR in Kombination mit anderen Standard-Diagnostikverfahren anzuwenden (OSTROSKY-ZEICHNER, 2012).

4.2. Diagnostische Methoden in der Veterinärmedizin

Wie in der Humanmedizin, umfassen die diagnostischen Möglichkeiten zum Nachweis einer Aspergillose klinische Symptome, histologische, serologische und kulturelle Ergebnisse sowie molekulare und bildgebende Verfahren (SEYEDMOUSAVI et al., 2015). Besonders beim Vogel spielen auch pathologische Befunde eine bedeutende Rolle. Hier finden sich unterschiedlich große, gelbe Knötchen oder Plaques in den Atemwegen, der Lunge und den Luftsäcken. Auf belüfteten Membranen kann es auch zur Sporulation und somit zur Grünfärbung der Plaques kommen (SEYEDMOUSAVI et al., 2015).

Sinonasale und sinoorbitale Aspergillosen bei Hund und Katze können in der Computertomographie und der Rhinoskopie diagnostiziert werden. Speziell bei Katzen mit sinoorbitaler Mykose kann oft eine Hyperglobulinämie beobachtet werden, ausgelöst durch den chronischen Antigenkontakt (BARRS et al., 2012). Zur Diagnostik der disseminierten Form der Aspergillose beim Hund wird die Kombination aus bildgebenden Verfahren, Histologie, Serologie und klinischen Symptomen empfohlen. Andere chronische Erkrankungen der Nase, wie Neoplasien, Fremdkörper oder eine durch Zahnprobleme ausgelöste Rhinitis, sollten ausgeschlossen werden (SEYEDMOUSAVI et al., 2015).

Das Auffinden von Oxalatkristallen beim Rind kann ein Hinweis auf eine mykotische Pneumonie sein. Diese können in histologischen oder zytologischen Präparaten der Lunge zu sehen sein (MUNTZ, 1999). Der Diagnostik des mykotischen Aborts dient die Kombination aus dem Nachweis von Pilzelementen wie Hyphen und dem Vorliegen einer Plazentitis, fetaler Dermatitis oder Pneumonie (SEYEDMOUSAVI et al., 2015).

Die Diagnostik von *Aspergillus*-Infektionen der oberen Atemwege oder der Luftsäcke beim Pferd beruht vor allem auf der Endoskopie (DOBESOVA et al., 2012). Eine definitive Diagnose sollte jedoch in Kombination mit einer kulturellen Anzucht des Erregers gestellt werden (SEYEDMOUSAVI et al., 2015).

5. Aktueller Stand der antifungalen Therapie

Grundsätzlich sind die Möglichkeiten der Therapie invasiver Mykosen stark eingeschränkt, da nur drei Gruppen von Wirkstoffen zur Verfügung stehen. Hierzu gehören die Polyene, Azole und Echinocandine (THOMPSON & PATTERSON, 2008). Auch die Zielstrukturen, auf welche diese Therapeutika einwirken, beschränken sich auf nur zwei Angriffspunkte, die Zellwand und die Zellmembran des Pilzes.

Amphotericin B gehört zu den Polyenen und bindet an Ergosterol in der Zellmembran. Dies führt zur Bildung von Ionenkanälen, was den Zelltod auslöst. *A. terreus* ist die einzige *Aspergillus* Spezies, die eine natürliche Resistenz gegen Amphotericin B zeigt (THOMPSON & PATTERSON, 2008). Die Behandlung mit Amphotericin B kann zu erheblichen Nebenwirkungen führen, hierzu gehören Reaktionen, die mit der Applikation des Medikamentes in Zusammenhang stehen, wie Fieber, Schüttelfrost, Myalgien oder Erbrechen. Außerdem kann Amphotericin B nephrotoxisch wirken und eine Azotämie oder eine renale tubuläre Azidose auslösen (BATES et al., 2001). Diese Nephrotoxizität konnte mit der Entwicklung von neuen Formulierungen auf Lipidbasis verringert werden, die allerdings in höheren Dosen verabreicht werden müssen (THOMPSON & PATTERSON, 2008). Triazole hemmen die Ergosterol-Synthese in der Zellmembran indem sie das Cytochrom P450 Enzym des Pilzes inhibieren. Dies führt zu einer Dysfunktion der Zellmembran und schließlich ebenfalls zum Zelltod. Das humane Cytochrom P450 kommt in allen Körperzellen vor, aber vor allem in der Membran des endoplasmatischen Retikulums der Leberzellen, weshalb die Nebenwirkungen der Triazole vor allem die Leberfunktion betreffen (THOMPSON & PATTERSON, 2008).

Echinocandine stellen die neuste Klasse der Antimykotika dar und verfügen über einen besonderen Wirkmechanismus. Sie inhibieren die Synthese von 1,3- β -Glucan, einem Polysaccharid welches in der Zellwand vieler pathogener Pilze vorkommt und wirken dadurch fungistatisch (THOMPSON & PATTERSON, 2008). Bekannte Nebenwirkungen einer Behandlung mit Echinocandinen können eine Erhöhung der Transaminasen-Werte oder Überempfindlichkeitsreaktionen bei schneller Gabe über Infusionen sein (BENNETT, 2006).

Wirkstoff- gruppe	Vertreter	Wirkmechanismus	Nebenwirkungen
Polyene	Amphotericin Desoxycholat liposomales Amphotericin B	Erhöhung der Permeabilität der Zellmembran durch Bindung an Ergosterol, fungizid	Nephrotoxizität
Triazole	Voriconazol Itraconazol Posaconazol	Hemmung des Cytochrom P450 Enzyms, fungizid	Störung der Leberfunktion
Echinocandine	Caspofungin Micafungin Anidulafungin	Hemmung der Synthese von 1,3- β - Glucan, fungistatisch	Erhöhung der Transaminasen- Werte

Abbildung 6: Übersicht über die Gruppen der verfügbaren Antimykotika und deren Wirkung

Lange Zeit war Amphotericin B das Therapeutikum erster Wahl für Patienten mit invasiver Aspergillose. Mittlerweile wird Voriconazol als Ersttherapeutikum empfohlen, da es eine bessere Wirksamkeit zeigt und die Überlebenschancen der Patienten erhöht (STEINBACH & STEVENS, 2003). In den letzten Jahren wird eine verstärkte Bildung von Resistenzen gegen Azole beobachtet. Gründe hierfür sind der extensive Gebrauch dieser Substanzen in der Landwirtschaft und auch der prophylaktische Einsatz zur Behandlung von Hochrisikopatienten (AZEVEDO et al., 2015). Echinocandine sind vor allem durch ihren andersartigen Wirkmechanismus interessant und werden deshalb in der Salvage-Therapie eingesetzt, wenn andere Therapeutika bereits versagt haben. Eine Kombinationstherapie aus Voriconazol und Caspofungin führt zu einer effektiveren Bekämpfung des Pilzes und damit zu einer verringerten Sterblichkeit, da hierbei sowohl die Zellmembran als auch die Zellwand angegriffen werden (MARR et al., 2004b).

In der Veterinärmedizin gibt es verschiedene Strategien zur Therapie der

Aspergillose. Jedoch gibt es für *Aspergillus*-Infektionen in großen Geflügelbeständen derzeit keine sinnvollen Therapiemöglichkeiten und auch keine Impfstoffe (SEYEDMOUSAVI et al., 2015). Zur Behandlung einzelner Vögel wird in der Regel eine Kombination mehrerer Antimykotika, wie zum Beispiel Amphotericin B und ein Azol, topisch oder systemisch eingesetzt. Wenn eine chirurgische Resektion der Granulome möglich ist, kann dies den Therapieerfolg positiv beeinflussen (SEYEDMOUSAVI et al., 2015).

Die disseminierte Aspergillose des Hundes ist eine schwer zu behandelnde Erkrankung mit schlechter Prognose, zumal die Tiere in der Regel erst in fortgeschrittenem Krankheitsstadium vorgestellt werden. Eine Langzeitbehandlung mit Itraconazol oder Voriconazol über bis zu 3 Jahre kann die Überlebenszeit verlängern, ist aber sehr kostenintensiv (ZHANG et al., 2012). Bei der sinonasalen Aspergillose wird die chirurgische Abtragung der Plaques und eine anschließende topische Behandlung mit Azolen empfohlen (SEYEDMOUSAVI et al., 2015). Eine ebenfalls vielversprechende Therapiemöglichkeit ist die Spülung der Nasenhöhle und der Nasennebenhöhlen mit Azolen über bilateral angebrachte Katheter. Abhängig von der Schwere der Erkrankung kann bereits eine solche Spülung ausreichend sein, um eine Remission zu erreichen (SEYEDMOUSAVI et al., 2015).

Beim Wiederkäuer ist die Behandlung von Einzeltieren mit Antimykotika in der Regel nicht möglich, da diese einerseits einen großen Kostenaufwand darstellt und es andererseits zu Rückständen der Medikamente in Milch oder Fleisch kommen kann. Daher beschränken sich Maßnahmen zur Bekämpfung der Aspergillose beim Rind auf die Verhinderung einer Erkrankung, indem beispielsweise prädisponierende Faktoren beseitigt werden (SARFATI et al., 1996).

Bei der Luftsackmykose des Pferdes sollte neben der medikamentösen auch gleichzeitig eine chirurgische Therapie erfolgen. Der bevorzugte Ansatz ist hierbei, betroffene Arterien zu obliterieren um mögliche weitere, tödlich verlaufende Blutungen zu verhindern (LEPAGE & PICCOT-CREZOLLET, 2005).

6. Der *High Osmolarity Glycerol* (HOG) Signalweg

6.1. Die Stressantwort über den HOG-Signalweg in *A. fumigatus* und sein Potenzial als Angriffspunkt für neue, antifungale Therapeutika

Alle Lebewesen, ob einzellig oder mehrzellig, interagieren mit ihrer Umwelt und müssen sich dabei an verschiedene Gegebenheiten anpassen, um ihre intrazelluläre Homöostase aufrechterhalten zu können. Das Wahrnehmen von Stresssignalen und das Antworten darauf sind Voraussetzung für das Überleben und die Vermehrung von Mikroorganismen im Körper eines Wirts (BAHN, 2008). Diese Anpassungsreaktionen werden dabei meist über bestimmte Signalwege koordiniert, die in der Regel mehrere Komponenten enthalten, wie Sensoren bzw. Rezeptoren, Kinasen und Transkriptionsfaktoren (BAHN, 2008).

Einer der am besten charakterisierten Signalwege ist der HOG-Signalweg (BAHN, 2008). Er wurde in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* entdeckt und spielt hier eine entscheidende Rolle bei der Regulierung des Wasserhaushaltes unter hyper- und hypoosmotischen Bedingungen (HOHMANN, 2002). Neben osmotischem Stress wird der HOG-Signalweg in Pilzen auch durch andere externe Stressoren aktiviert. Hierzu gehören UV-Strahlung, oxidativer Stress, Schwermetallbelastung und Stress durch erhöhte Temperaturen (BAHN, 2008).

Der HOG-Signalweg besteht aus zwei Abschnitten, dem Zwei-Komponenten-System und dem Mitogen-aktivierte Protein-Kinase (MAPK) Modul. Das Zwei-Komponenten-System besteht aus einer Hybrid-Sensor-Kinase, einem *Histidine-containing Phosphotransfer* (Hpt) Protein und einem oder zwei Response-Regulatoren, die wahrgenommene Signale an das MAPK-Modul weitergeben. Das MAPK-Modul besteht aus einer MAPK (Mitogen-aktivierte Protein-Kinase), welche durch eine MAPKK (Mitogen-aktivierte Protein-Kinase Kinase) aktiviert wird. Die MAPKK ihrerseits wird durch eine MAPKKK (Mitogen-aktivierte Protein-Kinase Kinase Kinase) aktiviert. Die Aktivierung des MAPK-Moduls führt zur Expression bestimmter Zielgene, was die Antwort auf den ursprünglichen Stressor darstellt (BAHN, 2008). Abbildung 7 zeigt die Komponenten des HOG-Signalwegs in *A. fumigatus*.

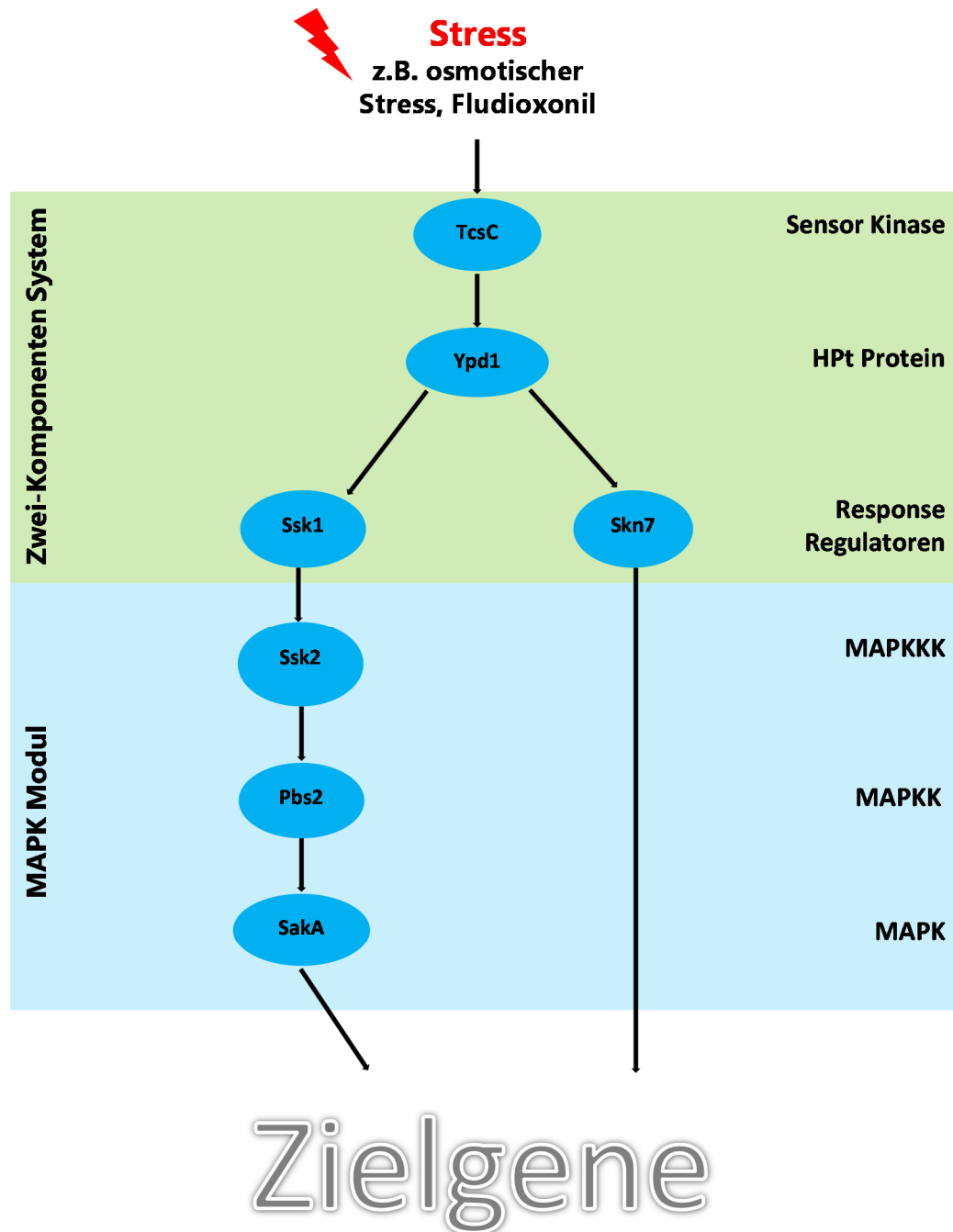


Abbildung 7: Der HOG-Signalweg in *A. fumigatus*

modifiziert nach Wiedemann, 2017 (WIEDEMANN, 2017)

Externe Stresssignale, wie beispielsweise osmotischer Stress, werden von *A. fumigatus* im ersten Schritt von der Hybrid-Histidin-Kinase TcsC (*Two-component system C*) wahrgenommen. Daraufhin wird diese Kinase an einem Histidinrest der Histidin-Kinase-Domäne autophosphoryliert. Der Phosphatrest wird auf einen Aspartatrest der *Receiver*-Domäne desselben Proteins übertragen. Im nächsten Schritt wird die Phosphatgruppe auf einen Histidinrest des HPt Proteins Ypd1 übertragen. Schließlich wird sie an einen Aspartatrest der Response-Regulatoren

Ssk1 oder Skn7 übermittelt (SHOR & CHAUHAN, 2015). Der Response-Regulator Skn7 fungiert als Transkriptionsfaktor und ist damit in der Lage, die Expression von Zielgenen auf direktem Weg zu aktivieren, wenn er durch Phosphorylierung aktiviert wird (VARGAS-PEREZ et al., 2007). Der aktivierte Response-Regulator Ssk1 interagiert mit der autoinhibitorischen Domäne (AID) der MAPKKK Ssk2, welche durch Umfaltung eine Serin/Threonin Kinase-Domäne freilegt, die nachfolgend am Threoninrest autophosphoryliert wird. Die somit aktivierte MAPKKK Ssk2 katalysiert die Phosphorylierung eines Serin- und Threoninrests der MAPKK Pbs2, welche anschließend ihrerseits die Phosphorylierung der MAPK SakA an einem Threonin- und einem Tyrosinrest katalysiert. Daraufhin kommt es zu einer Translokation der phosphorylierten MAPK SakA in den Zellkern (BRUDER NASCIMENTO et al., 2016), was letztlich zur Expression von Zielgenen für die Anpassung an den externen Stressor führt. Im Fall von hyperosmotischem Stress werden Gene exprimiert, die Enzyme codieren, die eine Schlüsselrolle in der Synthese von Glycerin spielen, wie beispielsweise die Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase und die Glycerin-3-Phosphatase. Dadurch wird Trehalose zu Glycerin abgebaut, die Anzahl an osmotisch wirksamen Teilchen steigt und somit wird die Balance im intrazellulären Wasserhaushalt wieder hergestellt (BAHN, 2008).

Wird der HOG-Signalweg auf künstlichem Weg aktiviert, führt das zu einer massiven Verschiebung des osmotischen Gleichgewichts und zu einem Einstrom von Wasser in die Pilzzelle (OKADA et al., 2005). Chemische Substanzen, die den HOG-Signalweg adressieren, sind zum Beispiel das Phenylpyrrollderivat Fludioxonil oder Iprodion, das zu den Dicarboximiden gehört (OKADA et al., 2005). Phenylpyrrole sind Derivate von Pyrrolnitrin, einem Sekundärmetaboliten welcher von Pseudomonaden aus Tryptophan hergestellt werden kann und antifungale Aktivität zeigt (FLOSS et al., 1971). Fludioxonil und Iprodion werden in der Landwirtschaft eingesetzt um verschiedene Pflanzenpathogene zu bekämpfen. Dazu gehört beispielsweise der Schimmelpilz *Botrytis cinerea*, der Auslöser der Grauschimmelfäule, welcher vor allem im Weinbau massive Probleme verursacht. Hier kann er zum einen reife Beeren der Weintraube befallen, genannt Edelfäule, zum anderen können auch unreife Beeren betroffen sein, was Rohfäule genannt wird. Voraussetzung für die Wirksamkeit dieser Fungizide ist eine feuchte Umgebung, da bei Trockenheit kein Wasser in die Pilzzellen einströmen kann (KOJIMA et al., 2004).

Auch bei *A. fumigatus* führt die Behandlung mit Fludioxonil zu einer Aktivierung des HOG-Signalwegs (MCCORMICK et al., 2012). Fludioxonil führt bei längerer Inkubation zu starken morphologischen Veränderungen der Zellen. In Folge der Aktivierung des HOG-Signalwegs kommt es zu einem massiven Einstrom von Wasser durch die Verschiebung des osmotischen Gleichgewichts. Dieser Wassereinstrom führt zu einem Anschwellen der Hyphen, was schließlich zu deren Aufplatzen führen kann (MCCORMICK et al., 2012). Die morphologischen Veränderungen der Zellen sind so lange präsent, wie Fludioxonil anwesend ist. Wird die Substanz entfernt, ist wieder ein normales Wachstum des Pilzes möglich (MCCORMICK et al., 2012).

6.2. Zwei-Komponenten-Systeme und Hybrid-Histidin-Kinasen (HHK) in pathogenen Pilzen

Es ist bekannt, dass Histidin-Kinasen (HK) in Bakterien, Archaeobakterien, Schleimpilzen, Pflanzen und Pilzen an der Regulierung vieler physiologischer Prozesse beteiligt sind. Ihre Funktion ist es, intra- und extrazelluläre Signale wahrzunehmen und weiterzuleiten (DEFOSSE et al., 2015). Histidin-Kinasen in Bakterien sind gut erforscht und an der Verarbeitung einer Vielzahl von Stimuli beteiligt. Dazu gehören physiologische Signale wie Licht, Temperatur oder Osmolarität, aber auch Konzentrationen von beispielsweise Antibiotika können über Histidin-Kinasen wahrgenommen werden (MASCHER et al., 2006). 1993 wurde erstmals festgestellt, dass Histidin-Kinasen auch in Pilzen vorkommen (OTA & VARSHAVSKY, 1993), sich aber im Aufbau von den Histidin-Kinasen bakterieller Zwei-Komponenten-Systeme unterscheiden. Üblicherweise besteht das Zwei-Komponenten-System der Bakterien aus zwei Proteinen, der Histidin-Kinase und einem Response-Regulator. Die Histidin-Kinase fungiert als Sensor in der Zellmembran und wird bei Aktivierung an ihrem Histidinrest autophosphoryliert. Dieser Phosphatrest wird anschließend auf den Aspartatrest eines Response-Regulators übertragen (His → Asp). Der phosphorylierte Response-Regulator fungiert dann in der Regel als Transkriptionsfaktor und aktiviert die Expression von Zielgenen im Zellkern (MASCHER et al., 2006). Zwei-Komponenten-Systeme in Pilzen unterscheiden sich hiervon in zwei Punkten, wie in Abbildung 8 schematisch dargestellt ist. Zum einen bestehen sie aus drei Proteinen, der Histidin-Kinase, dem Response-Regulator und dem HPt Protein. Die Funktion des HPt Proteins ist es, den Phosphatrest von der Histidin-Kinase zum Response-Regulator zu

transportieren (FASSLER & WEST, 2013). Zum anderen finden vier Phosphorylierungen statt: Die Histidin-Kinase wird an einem Histidinrest ihrer Kinase-Domäne autophosphoryliert. Dieser Phosphatrest wird anschließend auf einen Aspartatrest innerhalb desselben Proteins (*Receiver* Domäne) übertragen (His → Asp). Im nächsten Schritt wird der Phosphatrest auf einen Histidinrest des HPT Proteins transferiert (His → Asp → His) und von hier auf einen Aspartatrest der Response-Regulatoren (His → Asp → His → Asp) (FASSLER & WEST, 2013). Da die ersten beiden Phosphorylierungsschritte in demselben Protein stattfinden und nicht, wie in Bakterien, in zwei verschiedenen Proteinen, nennt man die Histidin-Kinasen der Pilze Hybrid-Histidin-Kinasen (DEFOSSE et al., 2015).

Zwei-Komponenten Systeme

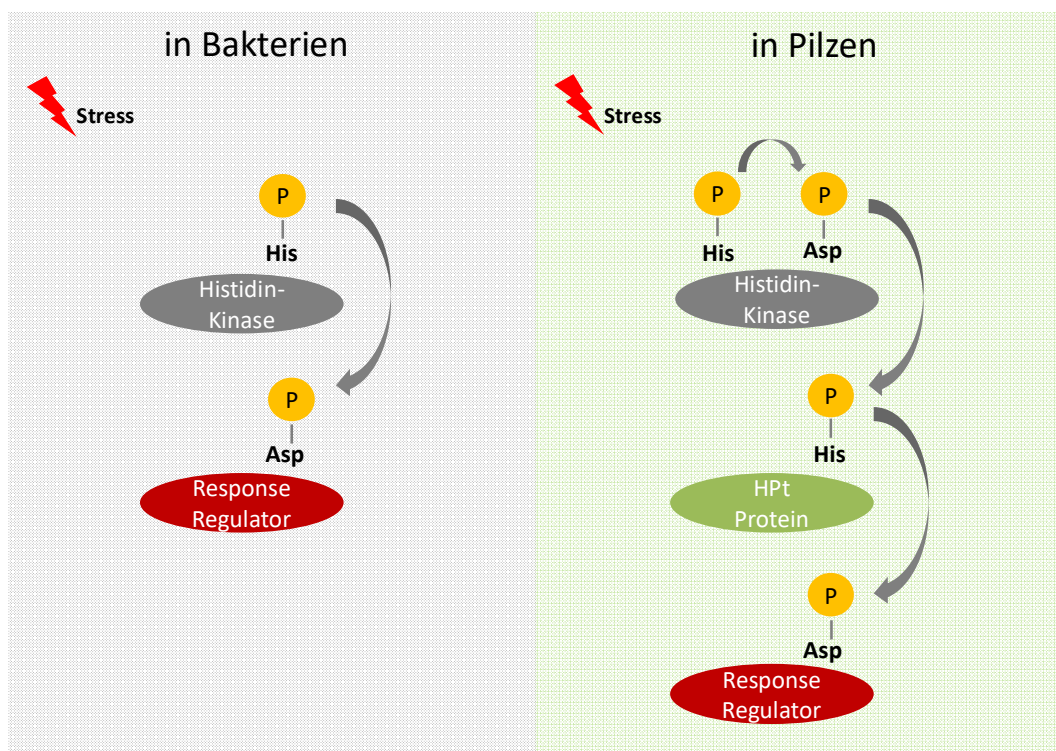


Abbildung 8: Vergleich der Zwei-Komponenten Systeme in Bakterien und in Pilzen

Hybrid-Histidin-Kinasen in Pilzen sind aus drei Bereichen aufgebaut. Der N-terminale Teil des Proteins (Sensor Domäne) ist hoch variabel in seiner Sequenz und Länge. Er bestimmt, welche Arten von Signalen wahrgenommen werden können. Der zentrale Bereich des Proteins besteht aus der Histidin-Kinase und der HATPase_c Domäne (*Histidine kinase-like ATPase catalytic domain*). Den C-terminalen Teil bildet die sogenannte *Receiver* Domäne, welche in Pilzen hoch konserviert ist (DEFOSSE et al., 2015). Die erste Klassifikation der Hybrid-

Histidin-Kinasen der *Ascomycota* entstand 2003, indem sie anhand der N-terminalen Sensor Domäne in elf Gruppen (I-XI) eingeteilt wurden (CATLETT et al., 2003). Einige Jahre später wurde gezeigt, dass Hybrid-Histidin-Kinasen der *Basidiomycota* in sieben Gruppen eingeteilt werden können (LAVIN et al., 2010). Mittlerweile wurden beide Systeme miteinander kombiniert und um neue Daten erweitert, sodass Hybrid-Histidin-Kinasen in Pilzen anhand ihres N-Terminus derzeit in 16 Gruppen unterteilt werden (DEFOSSE et al., 2015).

Obwohl es bereits gelang, einige Hybrid-Histidin-Kinasen in Pilzen zu charakterisieren, ist die Funktion vieler Gruppen von HKK noch immer unklar. Am meisten bekannt ist über Hybrid-Histidin-Kinasen die der Gruppe III angehören (DEFOSSE et al., 2015). Der N-Terminus der Typ III Hybrid-Histidin-Kinasen ist durch eine Wiederholung von Alpha-Helix Motiven gekennzeichnet, welche aus ca. 50 Aminosäuren bestehen und HAMP-Domänen genannt werden (KILANI & FILLINGER, 2016). Die Bezeichnung „HAMP-Domäne“ setzt sich aus den Anfangsbuchstaben der Proteine zusammen, in welchen diese Domänen vorkommen (Histidin-Kinasen, Adenylat-Cyclasen, Methyl-akzeptierende-Proteine und Phosphatasen) (DEFOSSE et al., 2015). Typ III Hybrid-Histidin-Kinasen besitzen ein Cluster aus mehreren HAMP-Domänen. Die Zahl der HAMP-Domänen kann dabei unterschiedlich sein. Das gesamte Cluster bildet eine funktionelle Einheit, die es möglich macht, externe Stresssignale wahrzunehmen und anschließend durch Konformationsänderungen die Aktivität der Histidin-Kinase zu modulieren (DEFOSSE et al., 2015). In *A. fumigatus* ist die Hybrid-Histidin-Kinase TcsC der einziger Vertreter dieser Typ III Hybrid-Histidin-Kinasen und ihr N-terminaler Teil besteht aus sechs HAMP-Domänen (MCCORMICK et al., 2012).

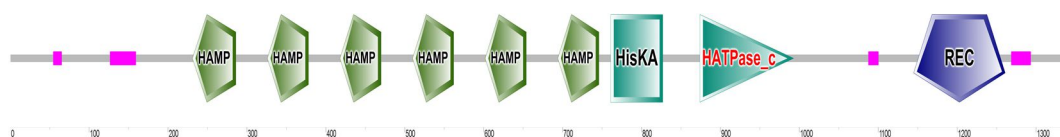


Abbildung 9: Die Hybrid-Histidin-Kinase TcsC (*Two-component system C*) in *A. fumigatus*

Quelle: Vorhersage der Domänen mittels des SMART-Programms

Der N-terminale Teil des TcsC Proteins, bestehend aus sechs HAMP-Domänen, ist in der Lage, Stresssignale wahrzunehmen. Dies führt zur Aktivierung der Histidin-Kinase-Domäne (HisKA), welche durch die *Histidine-like ATPase catalytic domain* (HATPase_c) an einem Histidinrest

autophosphoryliert wird. Der Phosphatrest wird anschließend intramolekular auf einen Aspartatrest der *Receiver* Domäne (REC) übertragen.

Es wurde für einige pflanzenpathogene Pilze gezeigt, dass Typ III Hybrid-Histidin-Kinasen die antifungale Wirkung von Fludioxonil und Iprodion vermitteln, indem sie den HOG-Signalweg aktivieren (KOJIMA et al., 2004). Auch in *A. fumigatus* ist die Aktivierung des HOG-Signalwegs und die Phosphorylierung der MAPK SakA von der Hybrid-Histidin-Kinase TcsC abhängig (MCCORMICK et al., 2012). Es konnte gezeigt werden, dass eine *A. fumigatus* $\Delta tcsC$ Mutante nicht mehr in der Lage ist, sich an hyperosmotischen Stress anzupassen und zudem eine Resistenz gegen Fludioxonil und Iprodion aufweist (MCCORMICK et al., 2012). Dies macht deutlich, dass TcsC ein essentielles Protein für die Aktivierung des HOG-Signalwegs in *A. fumigatus* ist und es somit einen interessanten Angriffspunkt für die Entwicklung neuer antifungaler Therapeutika darstellt.

III. PUBLIKATIONEN

1. Publikation 1

International Journal of Medical Microbiology 307 (2017) 200–208



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Medical Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijmm



Molecular characterization of *Aspergillus fumigatus* TcsC, a characteristic type III hybrid histidine kinase of filamentous fungi harboring six HAMP domains



Anja Spadinger, Frank Ebel^{*}

Institute for Infectious Diseases and Zoonoses, Ludwig-Maximilians-University, Munich, Germany

ARTICLE INFO

Keywords:

Type III hybrid histidine kinase
Fludioxonil
HAMP domain
HOG pathway

ABSTRACT

The type III hybrid histidine kinase (HHK) TcsC enables the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus* to thrive under hyperosmotic conditions. It is, moreover, of particular interest, since it is the target of certain antifungal agents, such as fludioxonil. This study was aimed at a functional characterization of the domains that constitute the sensing and the kinase module of TcsC. The sensing module consists of six HAMP domains, an architecture that is commonly found in type III HHKs of filamentous fungi. To dissect the functional role of the individual domains, we have analyzed a set of truncated derivatives of TcsC with respect to their impact on fungal growth and their ability to respond to hyperosmotic stress and fludioxonil. Our data demonstrate that the TcsC kinase module *per se* is constitutively active and under the control of the sensing module. We furthermore found that the sixth HAMP domain alone is sufficient to arrest the kinase module in an inactive state. This effect can be partially lifted by the presence of the fifth HAMP domain. Constructs harboring more than these two HAMP domains are *per se* inactive and all six HAMP domains are required to enable a response to fludioxonil or hyperosmotic stress. When expressed in an *A. fumigatus* wild type strain, the construct harboring only the sixth HAMP domain exerts a strong dominant negative effect on the native TcsC. This effect is successively reduced in other constructs harboring increasing numbers of HAMP domains. To our knowledge, this is the first molecular characterization of a type III HHK containing six HAMP domains. Our data strongly suggest that TcsC is a positive regulator of its MAPK SakA and thereby differs fundamentally from the prototypic yeast type III HHK DhNik1 of *Debaryomyces hansenii*, which harbors only five HAMP domains and acts as a negative regulator of its MAPK.

1. Introduction

Fungi are saprophytic organisms that are ubiquitously present in the environment. Their ability to grow under a wide range of conditions requires an efficient ability to adapt to environmental changes (Bahn et al., 2007). Examples for such fungal-specific signaling molecules are type III HHKs that enable adaption to hyperosmotic conditions (Defosse et al., 2015). An exception is the model yeast *Saccharomyces cerevisiae* that lacks a type III HHK and relies on the type VI HHK Sln1 instead. Both, type III HHKs and Sln1 are linked to the High Osmolarity Glycerol (HOG) pathway, which consists of a phospho-relay system and a mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade (Hohmann, 2009).

In *S. cerevisiae*, a permanent Sln1 activity is required to retain the HOG pathway in an inactive state (Maeda et al., 1994). A deleterious phenotype caused by uncontrolled and lethal activation of the HOG pathway was also expected for certain yeast type III HHK mutants and these signaling kinases have therefore been functionally characterized

by heterologous expression in *S. cerevisiae*. DhNik1 from *Debaryomyces hansenii* and Clnik1 from *Candida lusitanae* are active under normoosmotic conditions and can therefore complement Sln1-deficiency in *S. cerevisiae* (Meena et al., 2010; Randhawa et al., 2016), whereas *C. albicans* CaNik1 lacks this ability (Nagahashi et al., 1998). Another remarkable difference between DhNik1/Clnik1 on the one and CaNik1 on the other side was evident after heterologous expression of the corresponding kinase modules: The DhNik1 kinase module is inactive (Meena et al., 2010), whereas the correspondingly CaNik1 construct causes a phenotype resembling that provoked by artificial activation of the HOG pathway (El-Mowafy et al., 2013).

All HHKs contain a conserved C-terminal kinase module, but they differ in their N-terminal sensing modules. According to these differences they are classified into eleven families (Catlett et al., 2003). The sensing module of type III HHKs consists of several HAMP domains, which are present in histidine kinases, adenyl cyclases, methyl-accepting proteins and phosphatases. Single HAMP domains are found in

^{*} Corresponding author.
E-mail address: frank.ebel@lmu.de (F. Ebel).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2017.05.002>

Received 21 February 2017; Received in revised form 4 May 2017; Accepted 9 May 2017
1438-4221/ © 2017 Elsevier GmbH. All rights reserved.

bacterial two-component systems (Aravind and Ponting, 1999), whereas poly HAMP domain clusters are a unique feature of fungal HHKs.

Many type III HHKs in yeasts (e.g. DhNik1, CaNik1 and Clnik1) possess five HAMP domains, whereas filamentous fungi usually harbor type III HHKs with six HAMP domains. Mutants in the latter genes are viable (Defosse et al., 2015) suggesting that these type III HHKs are not required to keep the HOG pathway in an inactive state. Moreover, data obtained for the type III HHKs of *Neurospora crassa*, *Cochliobolus hesterostrophus*, *Colletotrichum lagenarium*, *Alternaria brassicola* and *Aspergillus fumigatus* suggest that these kinases are positive regulators of their respective HOG MAPK (Kojima et al., 2004; Yoshimi et al., 2005; Dongo et al., 2009; McCormick et al., 2012). If so, the Bos1 kinase of the plant pathogen *Botrytis cinerea* is the exception from this rule. Mutants lacking this type III HHK showed a constitutive hyperphosphorylation of the corresponding MAPK Sak1 identifying Bos1 as a negative regulator of the HOG MAPK cascade. Surprisingly, the *bos1* mutants showed a normal growth despite of the permanent activation of Sak1 (Liu et al., 2008).

Fungal pathogens are a major threat for immunocompromised patients and the high mortality rates associated with invasive mycoses are in part due to the limited therapeutic options. In recent years, types III HHKs have attracted considerable interest as an attractive target for new antifungal strategies (Shor and Chauhan, 2015). The ability of the phenylpyrrole fludioxonil to harm plant pathogenic fungi by activation of the HOG pathway was first described by Kojima et al. (2004). Phenylpyrroles have been used for three decades in agriculture, but resistant field isolates have rarely been isolated suggesting that resistance is often linked to a fitness defect (Kilani and Fillinger, 2016).

TcsC is the sole type III HHK of the pathogenic mold *A. fumigatus*. A *tcsC* deletion mutant is viable, resistant to phenylpyrrole and dicarboximide antifungals and unable to adapt to hyperosmotic stress (McCormick et al., 2012). Moreover, fludioxonil immediately blocks the hyphal growth of *A. fumigatus*. The dramatic cellular swelling that begins two to four hours later is accompanied by an enhanced septation, an uncontrolled mitosis in all hyphal compartments and a dramatic reorganization of the cell wall (Wiedemann, Spadinger et al., 2016). Remarkably, the strong antifungal activity of the type III HHK-activating drugs fludioxonil and iprodione is not restricted to *A. fumigatus*, but also evident for many other pathogenic and clinically relevant molds (Wiedemann, Spadinger et al., 2016).

The aim of the current study was a more detailed characterization of the TcsC protein and its kinase module. Using a set of truncated TcsC proteins, we have found that the sensing module controls the kinase module, which *per se* is constitutively active. Moreover, the individual HAMP domains serve different functions with respect to the modulation of the kinase activity, the interaction with other TcsC molecules and the ability to respond to hyperosmotic stress and anti-fungal compounds like fludioxonil.

2. Results

2.1. Characterization of the TcsC kinase module

In order to investigate the activity of the TcsC kinase module (TcsC_{KIM}) without the HAMP domain cluster, we expressed amino acids (aa) 750–1337 of TcsC in the *A. fumigatus* strain AfS35 (compare Fig. 1A). Since we had to take into account that this kinase module could have a permanent and deleterious activity, we expressed it using a *tet-on* promoter system (Helmschrott et al., 2013). The doxycycline concentration used to induce expression had no significant impact on growth or conidiation of *A. fumigatus* (data not shown). Under non-induced conditions the respective strain grew normally, but activation by doxycycline resulted in a dramatic phenotype resembling that of fludioxonil-treated wild type hyphae (Fig. 2 D-G): Hyphal compartments were swollen (Fig. 2G), contained large numbers of nuclei (data

not shown) and their cell walls showed an increased amount of chitin and a reduced labelling by galactomannan-specific antibodies (Fig. 2I and H, respectively). These findings clearly demonstrate that the kinase module of TcsC is *per se* constitutively active.

Using the same inducible promoter system, we generated additional strains expressing N- or C-terminal GFP fusions of TcsC_{KIM} (GFP-TcsC_{KIM} and TcsC_{KIM}-GFP). Expression of these constructs resulted in the characteristic changes described for the TcsC_{KIM}-expressing strain (Fig. 2). Interestingly, the phenotype induced by TcsC_{KIM}-GFP was less pronounced than that caused by GFP-TcsC_{KIM} expression (Fig. 2N–P and J–L, respectively). Microscopic examination revealed a cytosolic localization for both GFP fusion proteins (Fig. 2M and Q).

The histidine residue at position 771 of the TcsC sequence is predicted to be the autophosphorylation site of the His Kinase A domain. We therefore constructed a mutated GFP-TcsC_{KIM}^{*}, in which this amino acid was replaced by an alanine residue. Expression of the corresponding fusion protein in *A. fumigatus* strain AfS35 did not result in any detectable phenotype (Supplementary Fig. 1) indicating that the deleterious effect of TcsC_{KIM} completely relies on its kinase activity. Taken together, these data demonstrate that, in the absence of osmotic stress, the kinase module is negatively regulated by the sensing module.

2.2. The role of individual HAMP domains in the control of the kinase module

In order to investigate the role of the different HAMP domains, we generated a set of GFP fusion proteins with sequential N-terminal deletions of the TcsC moiety (Fig. 1B). To avoid misfoldings, we included short linker regions between the truncated sensing module and the GFP moiety. These linkers consist of several residues of the respective HAMP-like domain. To determine the activity of the truncated TcsC fusion proteins, we expressed them in an *A. fumigatus* Δ tcsC mutant background. All GFP fusion proteins showed a homogeneous distribution in the cytosol (data not shown).

Under inducing conditions, the presence of HAMP₆ alone prevented the deleterious effect of the kinase module (Fig. 3A) indicating that HAMP₆ can repress the kinase activity. The presence of the penultimate HAMP₅ domain partially reversed this inhibition (Fig. 3A). On plates incubated for 24 h, the Δ tcsC strain expressing GFP-TcsC-HAMP₅₋₆ showed an inhibition zone around the doxycycline disk (Fig. 3B), and microscopic images taken after 24 h in fluid culture also showed a delayed growth, but no dramatic swelling (Fig. 3A). Control plates with AfS35 revealed that this effect was not caused by doxycycline itself (Fig. 3B). The inhibition zone of the strain expressing GFP-TcsC-HAMP₅₋₆ contracted dramatically upon further incubation (Fig. 3B). Hence, GFP-TcsC-HAMP₅₋₆ can impair growth, but it is unable to trigger the flow-blown phenotype of fludioxonil-treated wild type cells. Interestingly, a white ring separating both growth zones remained visible even after prolonged incubation times. Expression of GFP-TcsC-HAMP₅₋₆ in the wild type for 24 h also led to a retarded growth around the doxycycline disk. The inhibition zone had roughly the same size as the one found for the corresponding Δ tcsC variant. However, the fungal growth was less sparse (Fig. 3B) and after 48 h a negative impact on growth or conidiation was no longer detectable (Fig. 3A and B). Expression of all constructs containing more than two HAMP domains had no phenotype, which is exemplarily shown for GFP-TcsC-HAMP₄₋₆. No evidence for an active kinase was detectable, no matter whether the fusion proteins were expressed in a wild type or Δ tcsC mutant background (Fig. 3A and data not shown).

2.3. The role of individual HAMP domains in the response to fludioxonil and hyperosmotic stress

In the next step, we have analyzed the ability of the different truncated proteins to restore fludioxonil sensitivity in a Δ tcsC mutant background. GFP-TcsC-HAMP₅₋₆ was excluded from this analysis due to

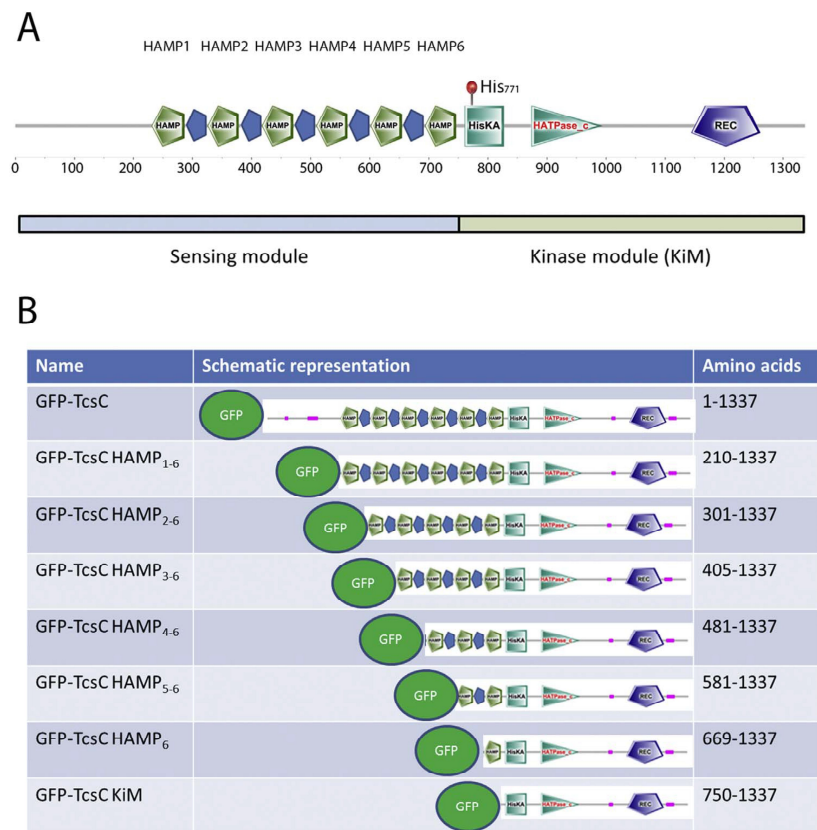


Fig. 1. A schematic representation of the TcsC protein (Afu2g03560) is shown in panel A. The numbering is representing the amino acid sequence. The indicated domains have been predicted by SMART, except for the HAMP-like domains that were identified according to the structural features described by Dunin-Horkawicz and Lupas (2010). The sensing and the kinase module are indicated. The HAMP domains are numbered according to the nomenclature used in the text. HAMP-like domains are shown as blue pentagons (in A and B) and the His₇₇₁ residue is indicated in A. Panel B shows the different GFP fusion proteins generated in this study. The partial TcsC sequences that were fused to GFP are named according to the amino acid sequence of full length TcsC (data base entry: Afu2g03560). HisKA = histidine kinase A domain; HATPase_C = histidine kinase-like ATPase; REC = receiver domain. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

its intrinsic, fludioxonil-independent activity. Expression of GFP-TcsC-HAMP₁₋₆ restored fludioxonil sensitivity, whereas all other fusion proteins were unable to complement the $\Delta tcsC$ mutant in this respect (Fig. 4). Higher concentrations of up to 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ fludioxonil also had no impact (data not shown) indicating that these fusion proteins are indeed non-responsive sensitive to fludioxonil. Hence, our data demonstrate that the N-terminal fusion of TcsC to GFP and even the loss of the approximately 200 N-terminal amino acids in GFP-TcsC-HAMP₁₋₆ had no dramatic impact on the responsiveness to fludioxonil.

The physiological role of TcsC is to enable *A. fumigatus* to thrive in a hyperosmotic environment. In the presence of 1.2 M sorbitol, strains like the $\Delta tcsC$ mutant are unable to respond properly and this resulted in swollen conidia and an inability to establish hyphal growth. GFP-TcsC-HAMP₁₋₆ and GFP-TcsC were the only constructs allowing growth and a normal hyphal morphology. Thus, only these proteins were able to trigger an adaptive response that enabled the fungus to re-establish osmotic homeostasis. (Supplementary Fig. 2 and data not shown).

2.4. Certain truncated TcsC proteins exert a dominant negative effect on full length TcsC

All fusion proteins summarized in Fig. 1B were also expressed in the *A. fumigatus* strain AfS35. The anti-fungal activity of fludioxonil on the *A. fumigatus* wild type has been described before and is exemplarily

shown for strain AfS35 (Fig. 5). A similar phenotype was observed for an AfS35 variant expressing GFP-TcsC-HAMP₁₋₆. Expression of GFP-TcsC-HAMP₂₋₆ led to an inhibition zone that resembled that of the wild type strain in size, but it was not completely free of fungal growth. With decreasing numbers of HAMP domains, this fungal growth increased more and more and the strain expressing GFP-TcsC-HAMP₆ was finally as resistant as the $\Delta tcsC$ mutant (Fig. 5).

We furthermore analyzed the impact of fludioxonil on hyphae and conidia of the different AfS35 derivatives by microscopy. Representative results for resting conidia are shown in Fig. 6. All strains germinated and grew normally in the absence of fludioxonil and were sensitive to fludioxonil under non-inducing conditions. Under inducing conditions, expression of GFP-TcsC-HAMP₁₋₆ resulted in a clear, wild type-like sensitivity (conidia were swollen and germ tube formation was strongly impaired). This susceptibility declined with decreasing numbers of HAMP domains, but only the strain expressing GFP-TcsC-HAMP₆ showed a complete resistance to fludioxonil. When short hyphae were treated with fludioxonil, expression of the different fusion proteins resulted in a growth inhibition and swelling that gradually increased with the number of HAMP domains of the respective construct (Supplementary Fig. 3). The strain expressing GFP-TcsC-HAMP₁₋₆ was severely inhibited by fludioxonil, while expression of GFP-TcsC-HAMP₆ resulted in a fully resistant strain. Hence, a dominant negative effect of GFP-TcsC-HAMP₆ on native, full length

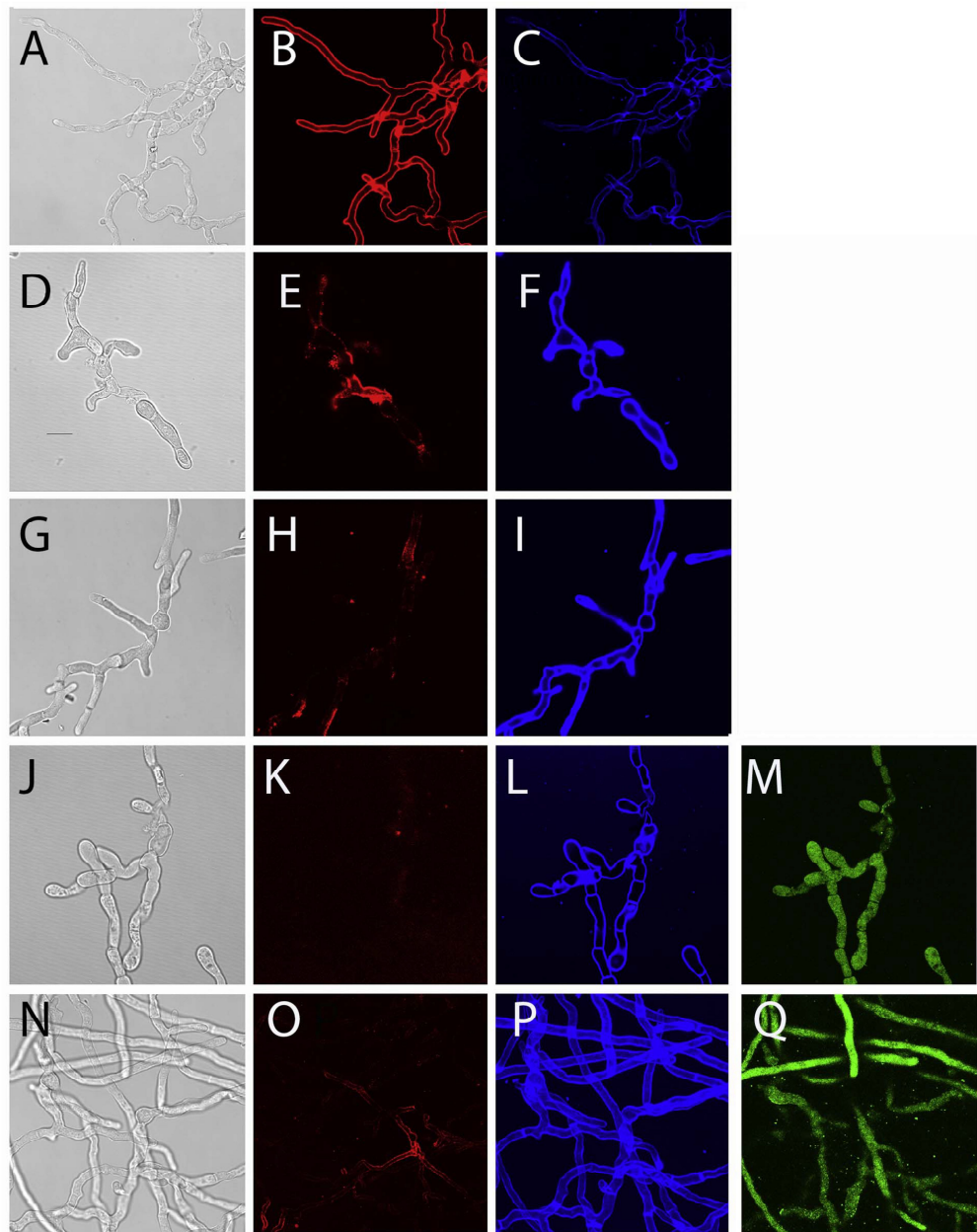


Fig. 2. Expression of the TscC kinase domain in the *A. fumigatus* strain AfS35. Short hyphae of AfS35 (A-F) and its derivatives expressing TscC_{KIM} (G-I), GFP-TscC_{KIM} (J-M) or TscC_{KIM}-GFP (N-Q) were analyzed by microscopy. Wild type hyphae treated in liquid medium with 2 µg/ml fluidoxonil for 8 h at 30 °C are shown in D-F. The corresponding non-treated controls are shown in A-C. The different panels show bright field micrographs as well as maximum projections of corresponding stainings with a galactomannan-specific antibody (red) and the chitin-binding dye Calcofluor White (blue). GFP fluorescence is shown in M and Q. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

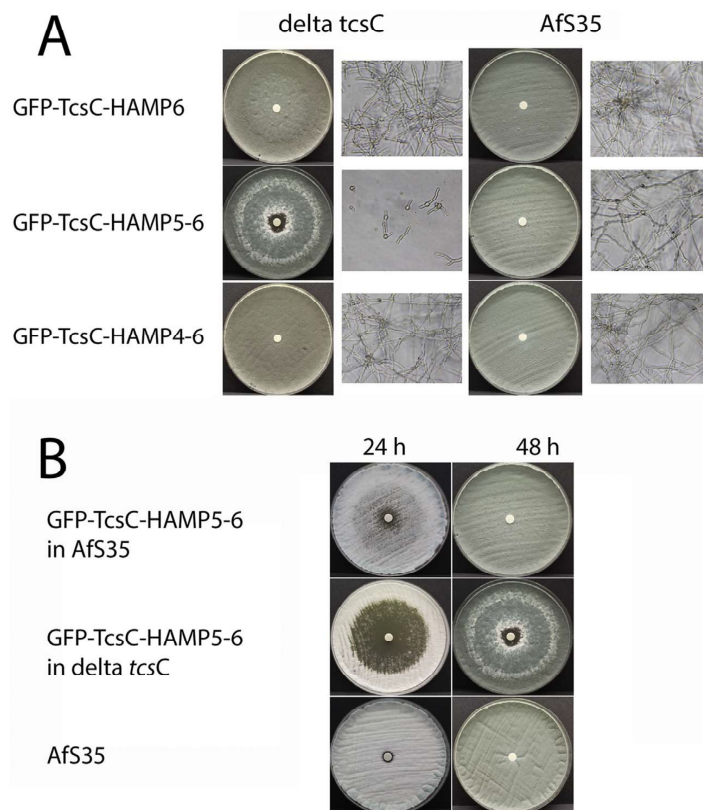


Fig. 3. Impact of truncated GFP-TcsC fusion proteins harboring different numbers of HAMP domains. The constructs indicated at the left margin were expressed in a *ΔtcsC* mutant or wild type (Afs35) background using a *tet-on* promoter system. To induce expression, paper disks containing doxycycline were placed in the center of the agar plates. Plates shown in panel A were incubated for 48 h at 37 °C. The corresponding microscopic images were taken after 24 h at 30 °C in medium containing 100 μg/ml doxycycline. The plates shown in panel B were incubated at 37 °C for 24 h or 48 h, as indicated.

TcsC was clearly evident in conidia and hyphae.

3. Discussion

Type III HHKs are characterized by poly-HAMP domain clusters (Catlett et al., 2003) that form a functional entity, which is able to sense hyperosmotic stress. Individual type III HHKs differ in their numbers of HAMP domains ranging from 5 to 11 (Defosse et al., 2015; Wiedemann et al., 2016). Several yeast type III HHKs harboring five HAMP domains were already studied in detail. The current study is the first molecular characterization of a type III HHK harboring six HAMP domains, a type commonly found in filamentous fungi. Moreover, it is the first analysis of a type III HHK that does not rely on a heterologous expression system.

The Bos1 protein of *B. cinerea* is an example for a type III HHK harboring six HAMP domains. Bos1 was shown to be a negative regulator of the MAPK Sak1 (Liu et al., 2008) and thereby resembles *S. cerevisiae* Sln1 (Posas et al., 1996). We have previously analyzed TcsC, the type III HHK of the pathogenic mold *A. fumigatus*. Deletion of the *tcsC* gene has no dramatic impact on the growth of this mutant and its MAPK SakA is not phosphorylated, both in the absence of stress and after exposure to fludioxonil or hyperosmotic stress (McCormick et al., 2012). These data suggest that TcsC is, in contrast to Bos1, a positive regulator of SakA. In the current study, we have expressed the kinase module of TcsC without HAMP domains. In the *A. fumigatus* wild type, this protein triggers a phenotype that perfectly resembles that of

fludioxonil-treated wild type cells. Replacement of the conserved histidine at position 771 by an alanine residue completely abolished this effect demonstrating that the autophosphorylation in the His kinase A domain is essentially required for the observed fludioxonil-like phenotype. These data strongly suggest that the kinase activity of TcsC is negatively regulated by the sensing module and that full length TcsC is indeed a positive regulator of SakA.

Type III HHKs of yeast often harbor five HAMP domains. In Nik1 of *C. albicans*, such a HAMP domain cluster exerts a negative regulation on the kinase module (El-Mowafy et al., 2013), whereas the corresponding truncated versions of the HHKs from *D. hansenii* (DhNik1) and *C. lusitaniae* (CINik1) execute a positive regulation. Hence, in these kinases the proximal HAMP₅ domain activates the signaling module, which is *per se* inactive (Randhawa et al., 2016; Meena et al., 2010). Moreover, HAMP₄ interacts with HAMP₅ and thereby establishes a switch, which controls the activity of the signaling module (Meena et al., 2010). When expressed in *S. cerevisiae*, DhNik1 and CINik1 were able to complement a *sln1* mutant (Randhawa et al., 2016; Meena et al., 2010), but CaNik1 is unable to do so (Nagahashi et al., 1998). In *S. cerevisiae* wild type, the CaNik1 kinase module caused a severe growth inhibition that was not dependent on its kinase activity (El-Mowafy et al., 2013). Taken together, these data suggest that DhNik1 and CINik1 are active kinases under ambient osmotic conditions and become inactivate in response to hyperosmotic stress, whereas the opposite pattern is suggested for CaNik1. Molecular dissection of *A. fumigatus* TcsC revealed that a truncated protein harboring the kinase module and the proximal

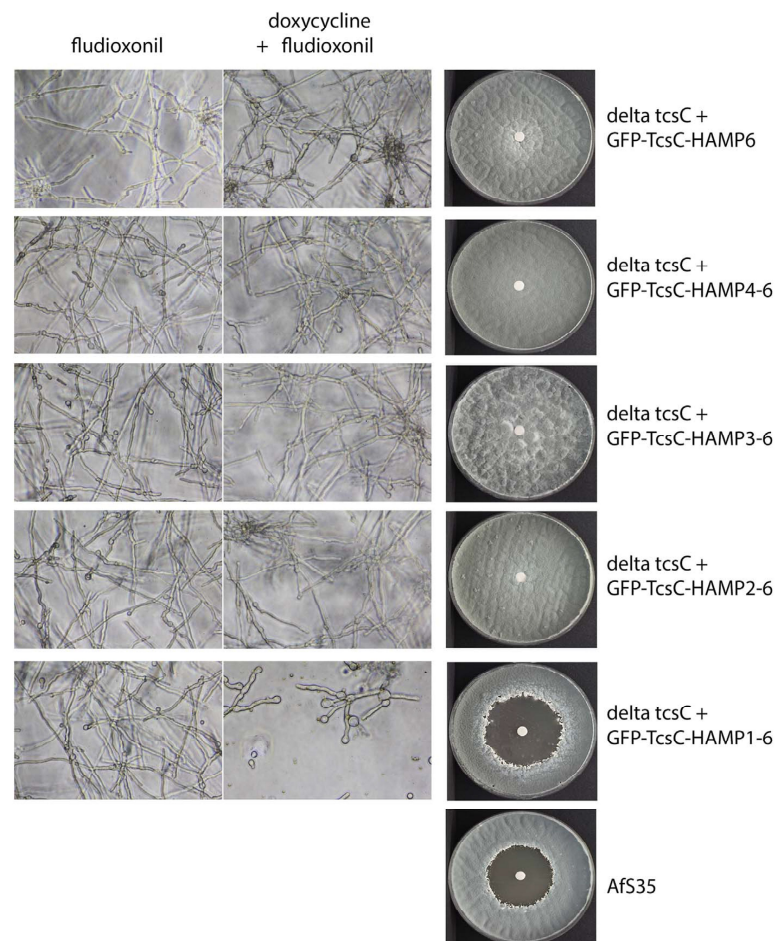


Fig. 4. Analysis of the ability of truncated GFP-TcsC fusion proteins to respond to fludioxonil. Fusion proteins harboring different numbers of HAMP domains were expressed in the $\Delta tcsC$ mutant using a *tet-on* promoter system. For microscopic analysis, short hyphae of the indicated strains were pre-grown in liquid medium. After addition of 2 $\mu\text{g/ml}$ fludioxonil, cultures were incubated in the presence or absence of doxycycline (100 $\mu\text{g/ml}$) for another 8 h at 37 °C. The plate images show the results of a disk diffusion assay with 5 μg fludioxonil per disk. The agar contained 100 $\mu\text{g/ml}$ doxycycline to induce expression. Plates were incubated for 48 h at 30 °C. Afs35 is shown as a wild type control.

HAMP₆ domain is inactive, indicating that HAMP₆ alone is sufficient to block the kinase activity.

The proximal HAMP domain can modulate the activity of the kinase module either in a positive (DhNik1, Clnik1) or in a negative (TcsC) manner. The detailed study of Meena et al. (2010) suggested that the HAMP domains 1–4 represent the actual sensing entity with the penultimate HAMP₄ domain being able to modulate the HAMP₅-mediated activation of the kinase module. Sequential deletions of the TcsC HAMP domains revealed that the penultimate HAMP₅ domain can partially antagonize the negative regulation by HAMP₆. Dimerization events between individual HAMP domains, which have been described for DhNik1 (Meena et al., 2010), may provide an explanation. In the case of TcsC, an interaction between the HAMP₅ and HAMP₆ may overwrite the negative control mediated by HAMP₆. The resulting partial activation is abrogated after addition of HAMP₄ suggesting that in an inactive TcsC molecule, HAMP₅ preferentially interacts with HAMP₄ and thereby allows HAMP₆ to shut down the kinase module. Hence, in the absence of activating stimuli, HAMP₁₋₄ neutralizes the activation mediated by HAMP₅. TcsC-HAMP₄₋₆, TcsC-HAMP₃₋₆ and TcsC-HAMP₂₋₆ showed no intrinsic kinase activity, were not responsive to fludioxonil and unable to trigger an adaptive response to hyper-

osmotic stress. Fludioxonil sensitivity and the ability to cope with hyperosmolar stress were only established when all six HAMP domains were present.

Another remarkable feature of the truncated TcsC proteins is their dominant negative effect on full length TcsC. This inhibitory activity was the strongest for TcsC-HAMP₆ and was inversely correlated to the number of HAMP domains of the construct. A crosstalk between different type III HHK molecules was already described for DhNik1 and DhNik1 Δ H1-4 after heterologous expression in *S. cerevisiae*. DhNik1 provides sensitivity of *S. cerevisiae* to fludioxonil, but expression of DhNik1 Δ H1-4 or co-expression of both proteins results in a resistant strain (Furukawa et al., 2012). Potential explanations are a competition for binding partners or the formation of inactive heterodimers. Inter-molecular interactions between the HAMP domains of bacterial two-component sensors have been described by Hulko et al. (2006) and Meena et al. (2010) provided evidence for a dimerization of individual HAMP domains of DhNik1. Moreover, Kaur et al. (2014) showed that a fusion of the HAMP domain cluster of DhNik1 to the maltose-binding protein forms dimers in solution. We therefore assume that TcsC-HAMP₆ is able to form inactive heterodimers with native TcsC.

Our data demonstrate that TcsC is a positive regulator of the MAPK

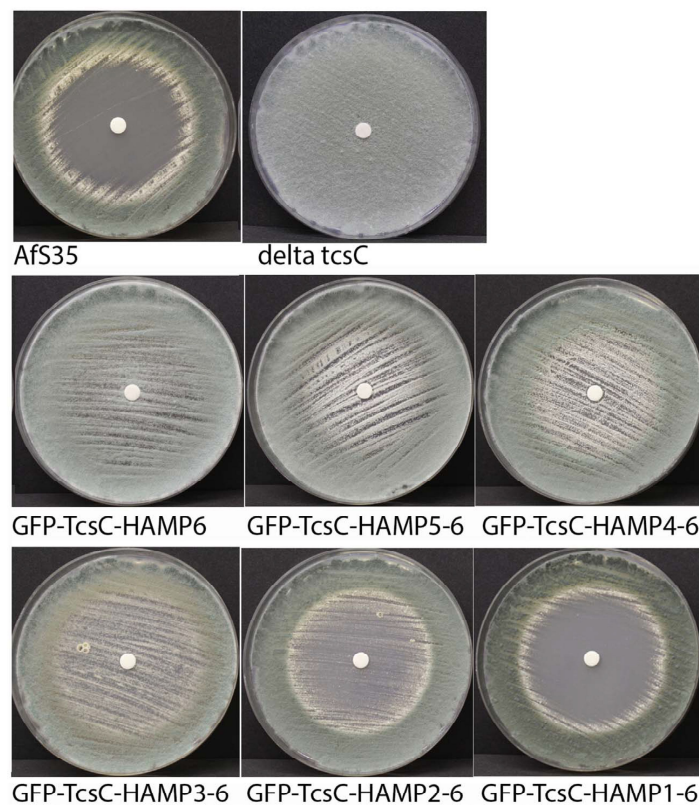


Fig. 5. Fusion proteins comprising truncated versions of TcsC exert a dominant negative effect when expressed in the *A. fumigatus* wild type. Disk diffusion assays were performed with the wild type strain Afs35, the $\Delta tcsC$ mutant and derivatives of Afs35 expressing the indicated GFP fusion proteins (compare Fig. 1B for more detailed information). Conidia were spread on plates containing 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ doxycycline. A paper disk containing 5 μg of fludioxonil was placed in the center of the plates that were subsequently incubated for 48 h at 30 °C.

SakA, which is evidenced by two findings: (1) a $\Delta tcsC$ mutant lacks SakA phosphorylation under normoosmotic conditions and hyperosmotic stress (McCormick et al., 2012) and (2) the TcsC kinase module alone triggers the fludioxonil phenotype and this depends on the conserved histidine residue of its His kinase A domain. Based on published data and the results of this study, we postulate that two subclasses of type III HHKs exist: Kinases of subclass IIIa are constitutively active under non-induced conditions and are negative regulators of their respective Hog1-like MAPKs, whereas subclass IIIb kinases, like TcsC, are positive regulators and have to be activated by either hyperosmotic stress or antifungal agents like fludioxonil. We assume that TcsC and thereby subclass IIIb are representative for the type III HHKs of most filamentous fungi.

4. Materials and methods

4.1. Strains and media

The $\Delta tcsC$ mutant and its parental strain Afs35 have been described previously (McCormick et al., 2012; Krappmann et al., 2006). For isolation of conidia, *A. fumigatus* strains were grown on Aspergillus Minimal Medium (AMM) agar supplemented with or without suitable selective agents (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pyrithiamine or 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ hygromycin). Conidia were harvested using glass beads and sterile water. The resulting suspensions were passed through two layers of Miracloth (Merck, Darmstadt, Germany) to remove debris and larger fungal fragments and the spore concentration was determined using a Neubauer chamber.

4.2. Sequence analysis

Protein sequences were obtained from the Aspergillus Genome Database (<http://www.aspgd.org/>). Domains were predicted using SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) and according to the data published by Dunin-Horkawicz and Lupas (2010).

4.3. Construction of strains expressing truncated versions of TcsC

To generate GFP fusion proteins, the respective partial sequences of TcsC (Afu2g03560) were amplified using the Q5 High Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs) and the oligonucleotides listed in Table 1. To obtain constructs, which allow a conditional expression, fragments were cloned into pSS015, a derivative of pSK379 harboring a *tet-on* promoter cassette (kindly provided by Johannes Wagener, Munich, Germany). To obtain a fusion to the C-terminus of GFP, the respective PCR product (with STOP codon) was cloned into the EcoRV site of pSS015. For a N-terminal GFP fusion protein, a suitable fragment (without STOP codon) was cloned into the PmeI site of pSS015. The kinase module of TcsC was also cloned with its STOP codon into the PmeI site of pSS015 to enable expression of this part of TcsC without GFP. All constructs were verified by sequencing and then used for protoplast transformation of *A. fumigatus* strain Afs35. Since we regularly encountered problems to transform $\Delta tcsC$ strains, we deleted the *tcsC* gene in the strains expressing the different constructs using the method described by McCormick et al. (2012). For expression of GFP-TcsC, the complete *tcsC* sequence was amplified using the oligonucleotide given in Table 1 and cloned into the EcoRV site of pSK379-sGFP.

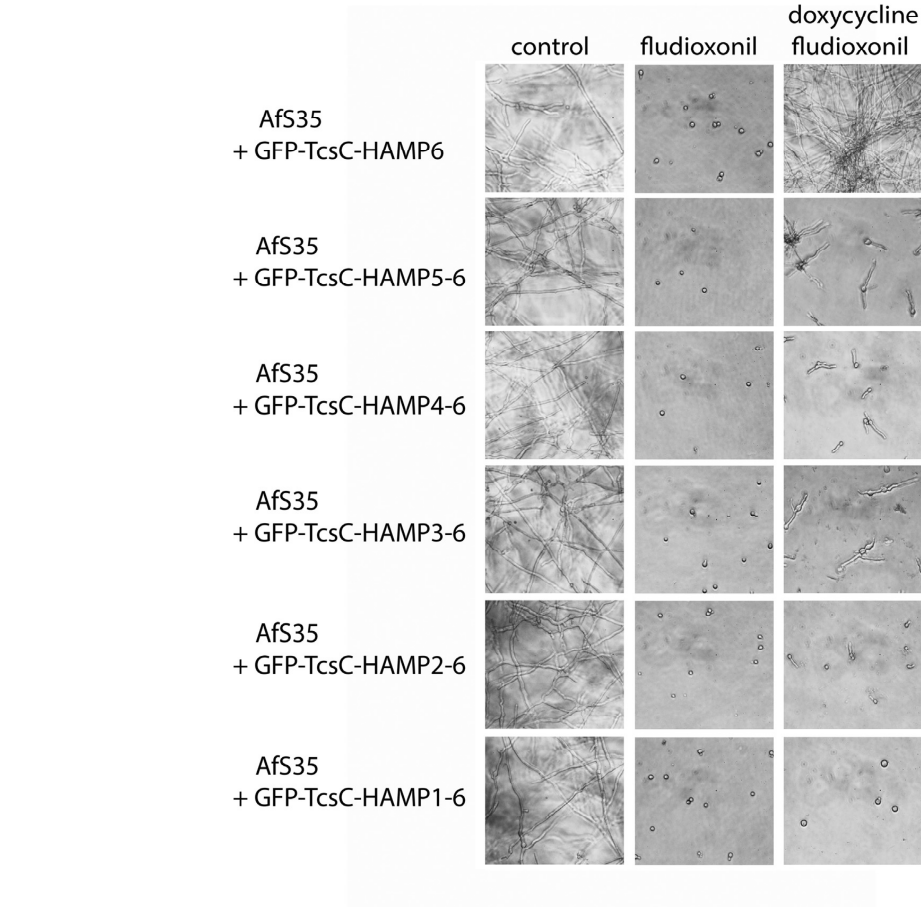


Fig. 6. Dominant negative impact of truncated TcsC fusion proteins analyzed by microscopy. Wells of a 24 well plate containing 1 ml AMM were inoculated with resting conidia of the indicated strains. Where indicated, the medium was supplemented with 100 µg/ml doxycycline and/or 2 µg/ml fludioxonil. Images were taken after 24 h at 37 °C.

Table 1
Oligonucleotides used in this study.

Primer	Sequence (5'-3')	Construct
HisKA-FOR	AAACATGGCTGCCAGGGAGGCAGCTGAGCTG	KiM + pSS015
TcsC-REV	TCATACGGCCTTTGGAGAGCGATAATCACTGACCCGT	
HisKA-FOR	AAACATGGCTGCCAGGGAGGCAGCTGAGCTG	KiM-GFP + pSS015
TcsC-REV-GFP	GCTACGGCCTTTGGAGAGCGATAATCACTGACCCG	
GFP-HisKA-FOR	GATGGCTGCCAGGGAGGCAG	GFP-KiM + pSS015
TcsC-REV	TCATACGGCCTTTGGAGAGCGATAATCACTGACCCGT	
GFP-HAMP6-FOR	GATGGCGGTCAAGCCAACGTGGAG	GFP-HAMP ₆ + pSS015
TcsC-REV	TCATACGGCCTTTGGAGAGCGATAATCACTGACCCGT	
GFP-HAMP5-FOR	GATGGCCAAGTCGACAATGTGGAAGGC	GFP-HAMP ₅₋₆ + pSS015
TcsC-REV	TCATACGGCCTTTGGAGAGCGATAATCACTGACCCGT	
GFP-HAMP4-FOR	GATGACGGATGTGTCTCGTGGC	GFP-HAMP ₄₋₆ + pSS015
TcsC-REV	TCATACGGCCTTTGGAGAGCGATAATCACTGACCCGT	
GFP-HAMP3-FOR	GATGTGGAATGAGCTGACTGTCAAC	GFP-HAMP ₃₋₆ + pSS015
TcsC-REV	TCATACGGCCTTTGGAGAGCGATAATCACTGACCCGT	
GFP-HAMP2-FOR	GATGCTTGGTGGACAGGCTCAGATC	GFP-HAMP ₂₋₆ + pSS015
TcsC-REV	TCATACGGCCTTTGGAGAGCGATAATCACTGACCCGT	
GFP-HAMP1-FOR	GATGGTTGAGAATGAAGATGTAGTC	GFP-HAMP ₁₋₆ + pSS015
TcsC-REV	TCATACGGCCTTTGGAGAGCGATAATCACTGACCCGT	
GFP-TcsC	GATGACTGGCGCAGACGAGACG	GFP-TcsC + psk379-GFP
TcsC-REV	TCATACGGCCTTTGGAGAGCGATAATCACTGACCCGT	
Muta-GFP-TcsC-FOR	AACATGAGTGCTGAGATCCGGACT	His to Ala exchange at position 771
Muta-GFP-TcsC-REV	TGCCAGAAATTCGGACTTTGTACG	

4.4. Introduction of point mutations

Replacement of the histidine residue at position 771 of the TcsC sequence by an alanine residue was performed using the Q5-Site-directed Mutagenesis Kit (New England Biolabs) according to the instructions of the vendor. The respective primers are listed in Table 1. The mutation was verified by sequencing.

4.5. Inhibition assays

For disk diffusion assays, 10^6 resting conidia of the desired strains were homogenously spread on an agar plate containing Sabouraud medium. To induce expression of GFP fusion proteins, the plate was supplemented with 100 µg/ml doxycycline. To analyze the intrinsic, deleterious activity of the constructs, paper disks containing 750 µg doxycycline were placed in the center of an agar plate. To determine the sensibility of the different strains to fludioxonil, paper disks were loaded with 5 µg fludioxonil. If not stated otherwise, plates were incubated for 48 h at 30 °C. Assays in liquid culture were performed in 24 well plates. Each well contained 1 ml AMM and 2×10^5 conidia. When indicated, fungal cells were grown to short hyphae before addition of doxycycline or/and fludioxonil. Samples were incubated without shaking at the indicated temperature. After fixation, they were analyzed by microscopy as described below.

4.6. Immunofluorescence analysis

Hyphae were grown in 24-well plates in AMM containing 100 µg/ml doxycycline. If appropriate, hyphae or resting conidia were treated with 2 µg/ml fludioxonil in AMM. Samples were fixed with 3.7% formaldehyde/PBS for 5 min, washed and analyzed by microscopy. For immunofluorescence, hyphae were grown on glass cover slips, fixed as described above and incubated with the galactomannan-specific monoclonal antibody L10-1 (Heesemann et al., 2011) for 30 min at 37°. Samples were washed three times with PBS and subsequently incubated with a Cy3-labelled anti-mouse antibody (Dianova, Hamburg, Germany). To stain cell wall chitin, samples were incubated with 1 mg/ml Calcofluor white (Sigma-Aldrich) for 1 min at RT. All samples were finally mounted and images were taken using a Leica SP-5 confocal laser scanning microscope (Leica Microsystems).

Acknowledgments

We thank Kirsten Niebuhr-Ebel for critical reading of the manuscript, Johannes Wagener for providing the plasmid pSS015 and the Brigitte und Wolfram Gedek-Stiftung for financial support.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2017.05.002>.

References

Aravind, L., Ponting, C.P., 1999. The cytoplasmic helical linker domain of receptor

- histidine kinase and methyl-accepting proteins is common to many prokaryotic signalling proteins. *FEMS Microbiol. Lett.* 176, 111–116.
- Bahn, Y.S., Xue, C., Idnurm, A., Rutherford, J.C., Heitman, J., Cardenas, M.E., 2007. Sensing the environment: lessons from fungi. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 57–69.
- Catlett, N.L., Yoder, O.C., Turgeon, B.G., 2003. Whole-genome analysis of two-component signal transduction genes in fungal pathogens. *Eukaryot. Cell.* 2, 1151–1161.
- Defosse, T.A., Sharma, A., Mondal, A.K., Dugé de Bernonville, T., Latgé, J.P., Calderone, R., Giglioli-Guivarc'h, N., Courdavault, V., Clastre, M., Papon, N., 2015. Hybrid histidine kinases in pathogenic fungi. *Mol. Microbiol.* 95, 914–924.
- Dongo, A., Bataillé-Simoneau, N., Campion, C., Guillemette, T., Hamon, B., Iacomini-Vasilescu, B., Katz, L., Simoneau, P., 2009. The group III two-component histidine kinase of filamentous fungi is involved in the fungicidal activity of the bacterial polyketide ambruticin. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 127–134.
- Dunin-Iorkawicz, S., Lupas, A.N., 2010. Comprehensive analysis of IIAMP domains: implications for transmembrane signal transduction. *J. Mol. Biol.* 397, 1156–1174.
- El-Mowafy, M., Bahgat, M.M., Bilitewski, U., 2013. Deletion of the HAMP domains from the histidine kinase CaNik1p of *Candida albicans* or treatment with fungicides activates the MAP kinase Hog1p in *S. cerevisiae* transformants. *BMC Microbiol.* 13, 209.
- Furukawa, K., Randhawa, A., Kaur, H., Mondal, A.K., Hohmann, S., 2012. Fungal fludioxonil sensitivity is diminished by a constitutively active form of the group III histidine kinase. *FEBS Lett.* 586, 2417–2422.
- Heesemann, L., Kotz, A., Echtenacher, B., Broniszewska, M., Routier, F., Hoffmann, P., Ebel, F., 2011. Studies on galactofuranose-containing glycostructures of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. *Int. J. Med. Microbiol.* 301, 523–530.
- Helmschrott, C., Sasse, A., Samantary, S., Krappmann, S., Wagener, J., 2013. Upgrading fungal gene expression on demand: improved systems for doxycycline-dependent silencing in *Aspergillus fumigatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 1751–1754.
- Hohmann, S., 2009. Control of high osmolarity signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 583, 4025–4029.
- Hulko, M., Berndt, F., Gruber, M., Linder, J.U., Truffault, V., Schultz, A., Martin, J., Schultz, J.E., Lupas, A.N., Coles, M., 2006. The IIAMP domain structure implies helix rotation in transmembrane signaling. *Cell* 126, 929–940.
- Kaur, H., Singh, S., Rathore, Y.S., Sharma, A., Furukawa, K., Hohmann, S., Ashish Mondal, A.K., 2014. Differential role of HAMP-like linkers in regulating the functionality of the group III histidine kinase DhNik1p. *J. Biol. Chem.* 289, 20245–20258.
- Kilani, J., Fillinger, S., 2016. Phenylpyrroles: 30 years, two molecules and (nearly) no resistance. *Front. Microbiol.* 7, 2014.
- Kojima, K., Takano, Y., Yoshimi, A., Tanaka, C., Kikuchi, T., Okuno, T., 2004. Fungicide activity through activation of a fungal signalling pathway. *Mol. Microbiol.* 53, 1785–1796.
- Krappmann, S., Sasse, C., Braus, G.H., 2006. Gene targeting in *Aspergillus fumigatus* by homologous recombination is facilitated in a nonhomologous end-joining-deficient genetic background. *Eukaryot. Cell.* 5, 212–215.
- Liu, W., Leroux, P., Fillinger, S., 2008. The HOG1-like MAP kinase Sak1 of *Botrytis cinerea* is negatively regulated by the upstream histidine kinase Bos1 and is not involved in dicarboximide- and phenylpyrrole- resistance. *Fungal Genet. Biol.* 45, 1062–1074.
- Maeda, T., Wurgler-Murphy, S.M., Saito, H., 1994. A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature* 369, 242–245.
- McCormick, A., Jacobsen, I.D., Broniszewska, M., Beck, J., Heesemann, J., Ebel, F., 2012. The two-component sensor kinase TcsC and its role in stress resistance of the human-pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. *PLoS One* 7, e38262.
- Meena, N., Kaur, H., Mondal, A.K., 2010. Interactions among HAMP domain repeats act as an osmosensing molecular switch in group III hybrid histidine kinases from fungi. *J. Biol. Chem.* 285, 12121–12132.
- Nagahashi, S., Mio, T., Ono, N., Yamada-Okabe, T., Arisawa, M., Bussey, H., Yamada-Okabe, H., 1998. Isolation of CaSlN1 and CaNik1, the genes for osmosensing histidine kinase homologues, from the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Microbiology* 144, 425–432.
- Posas, F., Wurgler-Murphy, S.M., Maeda, T., Witten, E.A., Thai, T.C., Saito, H., 1996. Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 two-component osmosensor. *Cell* 86, 865–875.
- Randhawa, A., Chawla, S., Mondal, A.K., 2016. Functional dissection of HAMP domains in NIK1 ortholog from pathogenic yeast *Candida lusitanae*. *Gene* 577, 251–257.
- Shor, E., Chauhan, N., 2015. A case for two-component signaling systems as antifungal drug targets. *PLoS Pathog.* 11, e1004632.
- Yoshimi, A., Kojima, K., Takano, Y., Tanaka, C., 2005. Group III histidine kinase is a positive regulator of Hog1-type mitogen-activated protein kinase in filamentous fungi. *Eukaryot. Cell.* 4, 1820–1828.
- Wiedemann, A., Spadinger, A., Löwe, A., Seeger, A., Ebel, F., 2016. Agents that activate the High Osmolarity Glycerol pathway as a means to combat pathogenic molds. *Int. J. Med. Microbiol.* 306, 642–651.

2. Publikation 2

International Journal of Medical Microbiology 306 (2016) 642–651



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Medical Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijmm

Agents that activate the High Osmolarity Glycerol pathway as a means to combat pathogenic molds



Annegret Wiedemann^{a,1}, Anja Spadinger^{a,1}, Axel Löwe^b, Allison Seeger^b,
Frank Ebel^{a,b,c,*}

^a Institute for Infectious Diseases and Zoonoses, Ludwig-Maximilians-University, Munich, Germany^b Max-von-Pettenkofer-Institute, Ludwig-Maximilians-University, Munich, Germany^c German Center for Infection Research (DZIF), Munich, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 July 2016

Received in revised form 7 September 2016

Accepted 26 September 2016

Keywords:

Antifungals

HOG pathway

Type III hybrid histidine kinase

TcsC

Fludioxonil

Hyperosmotic stress

*Aspergillus fumigatus**Aspergillus terreus*

Mucorales

Scedosporium

ABSTRACT

Treatment of invasive fungal infections often fails due to the limited number of therapeutic options. In this study, we have analyzed the impact of agents activating the High Osmolarity Glycerol (HOG) pathway on molds that cause infections in humans and livestock. We found that agents like fludioxonil and iprodione, have a clear anti-fungal activity against pathogenic *Aspergillus*, *Lichtheimia*, *Rhizopus* and *Scedosporium* species. Only *A. terreus* turned out to be resistant to fludioxonil, even though it is sensitive to iprodione and able to adapt to hyperosmotic conditions. Moreover, the *A. terreus* *tcsC* gene can fully complement an *A. fumigatus* Δ *tcsC* mutant, thereby also restoring its sensitivity to fludioxonil. The particular phenotype of *A. terreus* is therefore likely to be independent of its TcsC kinase. In a second part of this study, we further explored the impact of fludioxonil using *A. fumigatus* as a model organism. When applied in concentrations of 1–2 μ g/ml, fludioxonil causes an immediate growth arrest and, after longer exposure, a quantitative killing. Hyphae respond to fludioxonil by the formation of new septa and closure of nearly all septal pores. Mitosis occurs in all compartments and is accompanied by a re-localization of the NimA kinase to the cytoplasm. In the swollen compartments, the massive extension of the cell wall triggers a substantial reorganization resulting in an enhanced incorporation of chitin and, most strikingly, a massive loss of galactomannan. Hence, HOG-activating agents have dramatic cell biological consequences and may represent a valuable, future element in the armory that can be used to combat mold infections.

© 2016 Elsevier GmbH. All rights reserved.

1. Introduction

Invasive fungal infections represent a major threat for severely immunocompromised patients and are often associated with high mortality rates. Currently, *Aspergillus fumigatus* is the most common and important pathogenic mold, but infections by non-*Aspergillus* species are also increasing (Douglas et al., 2016) and some of these pathogens are even more difficult to treat than *Aspergillus* infections (Cortez et al., 2008). The spectrum of antimycotic agents that are in clinical use for invasive mycoses is small and consists essentially of polyenes, azoles and echinocandins. Azoles are most widely used, but the development of resistance to some

of these drugs has been reported for *A. fumigatus* (Azevedo et al., 2015), which underlines the need to develop new approaches in anti-fungal therapy.

Anti-fungal agents are not only used in human and veterinary medicine, but to a much larger extent in agriculture. Some of the agents used in the field attack fungi by harnessing the so-called High Osmolarity Glycerol (HOG) pathway (Kojima et al., 2004). This signalling cascade normally enables fungi to thrive under hyperosmotic conditions (Bahn, 2008). However, a pharmacological activation of the HOG pathway, e.g. by fludioxonil, causes a dramatic osmotic imbalance and consequently a massive influx of water (Okada et al., 2005). The use of HOG-activating agents therefore requires a humid environment, which limits their use in agriculture.

In bacteria, sensing and processing of stress signals largely relies on two-component systems that consist of a sensor histidine kinase and a response regulator. In filamentous fungi, hybrid histidine kinases (HHK) integrate both functions in a single polypeptide and

* Corresponding author at: Institute for Infectious Diseases and Zoonoses, Ludwig-Maximilians-University, Munich, Germany.

E-mail address: frank.ebel@lmu.de (F. Ebel).

¹ Both authors contributed equally.

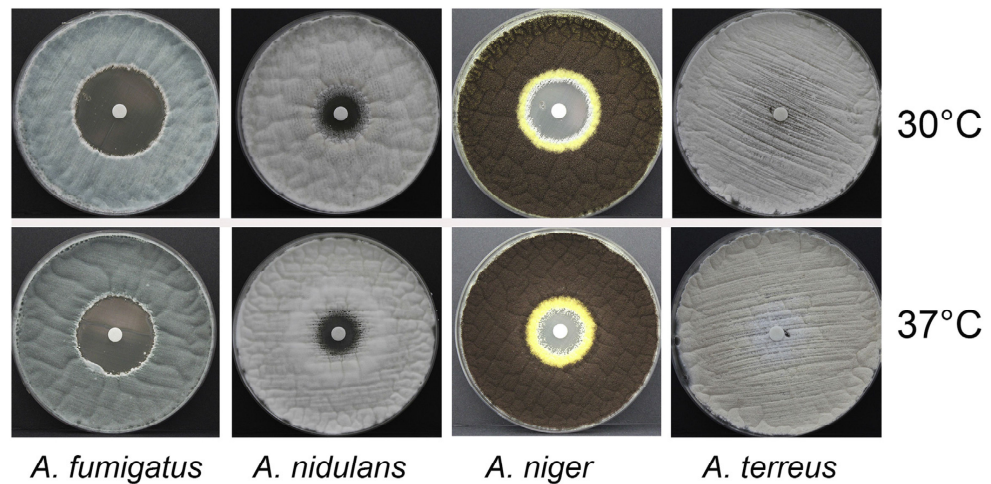


Fig. 1. Impact of fludioxonil on the growth of different *Aspergillus* species. The following strains have been analyzed in this agar diffusion assay: *A. fumigatus* D141, *A. nidulans* A26, *A. niger* DSM737 and *A. terreus* NIH 2624. 10^6 conidia of each strain were homogeneously spread on the surface of two Sabouraud plates. Paper disks containing 10 µg fludioxonil were placed in the centre of the plates. Pictures show plates after incubation for 2 days at either 30 °C or 37 °C.

transfer the phosphoryl group intramolecularly from a histidine to an aspartate residue (Shor and Chauhan, 2015). While their primary function is adaptation to high osmotic stress, group III HHK have also been shown to contribute to the virulence of several fungi (Bahn, 2008; Defosse et al., 2015). The sensing module of group III HHK consists of several HAMP domains (present in Histidine kinases, Adenyl cyclases, Methyl-accepting proteins and Phosphatases), which control the activity of the C-terminal kinase module (Defosse et al., 2015). Remarkably, group III HHK are not found in vertebrates (Shor and Chauhan, 2015), which makes them an attractive therapeutic target.

We have recently shown that the dramatic impact of HOG-activating agents, like fludioxonil, on *A. fumigatus* is mediated by the type III HHK TcsC (McCormick et al., 2012). In the current study we have investigated the impact of fludioxonil on *A. fumigatus* in more detail and furthermore analyzed the impact of the HOG-activating agents fludioxonil and iprodione on other major pathogenic molds.

2. Result

Fludioxonil inhibits growth of *A. nidulans* and *A. fumigatus* (Hagiwara et al., 2007; McCormick et al., 2012). Using a disk-diffusion assay we confirmed this and observed similar effects for *A. niger* and *A. flavus* (Fig. 1 and data not shown). *A. fumigatus* showed the highest sensitivity, whereas *A. terreus* strain NIH2624 was not inhibited at all (Fig. 1). Further testing of NIH2624 and two additional *A. terreus* strains on plates with paper disks containing 1, 10 and 100 µg fludioxonil revealed that *A. terreus* has a natural resistance to this agent (Suppl. Fig. S1A–C in the online version at DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2016.09.005>). Nevertheless, we observed a partial growth inhibition around fludioxonil-containing disks, but only at early time points, when the mycelial growth was still sparse (Suppl. Fig. S1D in the online version at DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2016.09.005>).

Fludioxonil damages susceptible fungi by activation of a type III HHK. In *A. fumigatus* this kinase is called TcsC (Afu2g03560) and contains 6 HAMP domains. The TcsC homolog of *A. terreus* in the data base (Q0C9V0/ATEG.09534) contains only four HAMP domains and lacks the C-terminal receiver domain, which represents an essential element of type III HHKs (Suppl. Fig. S2 in the

online version at DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2016.09.005>). This truncation could explain the striking fludioxonil resistance of *A. terreus*, but should also result in an inability to cope with hyperosmotic stress. However, *A. terreus* grows normally on plates containing 1.2 M sorbitol (Suppl. Fig. S3 in the online version at DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2016.09.005>) and in liquid culture it was able to tolerate even higher NaCl concentrations than *A. fumigatus* (2.5 M versus 2 M, data not shown). Even more striking, *A. terreus* is clearly sensitive to iprodione (Fig. 2A) and when treated with iprodione shows the characteristic phenotypes induced by HOG-activating agents, such as cellular swelling, elevated numbers of nuclei and tip lysis (Fig. 2B and D). This suggested that *A. terreus* possesses a functional TcsC protein. A closer inspection of the *A. terreus* tcsC gene in the data base (supercontig:CADRE:1.15:139557:141148:1) revealed that it is incomplete and contains a stretch of nucleotides that has not been defined yet. This prompted us to re-sequence the tcsC gene of strain NIH 2624 (accession number: HE995413). It turned out that *A. terreus* TcsC is highly homologous to *A. fumigatus* TcsC (91.2% identity) and contains all domains typically found in a type III HHK (Suppl. Fig. S2 in the online version at DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2016.09.005>). When expressed in an *A. fumigatus* Δ tcsC mutant, *A. terreus* tcsC allowed growth under hyperosmotic conditions and conferred sensitivity for fludioxonil and iprodione (Fig. 3), i.e. it fully complemented the mutant phenotype.

The sensitivity of different *Aspergillus* species to fludioxonil and iprodione prompted us to extend our analysis to other pathogenic molds. Disk diffusion assays revealed that growth of the *Mucorales* species *Lichtheimia corymbifera* and *Rhizopus oryzae* is inhibited by both agents (Fig. 4). *Scedosporium minutisporum* is also sensitive to both agents, but the inhibition zone observed for fludioxonil was strikingly larger than for any other mold tested (Fig. 4). This high sensitivity to fludioxonil was also observed for *S. prolificans*, *S. aurantiacum* and *Pseudallescheria boydii* (data not shown).

We next searched the genomes of all species tested in Figs. 1 and 4 for TcsC homologs using BlastP. In case that a genome sequence was not available, we analyzed a closely related species. All these genomes contained one protein with high homology to TcsC (Table 1). The most striking differences were observed for the

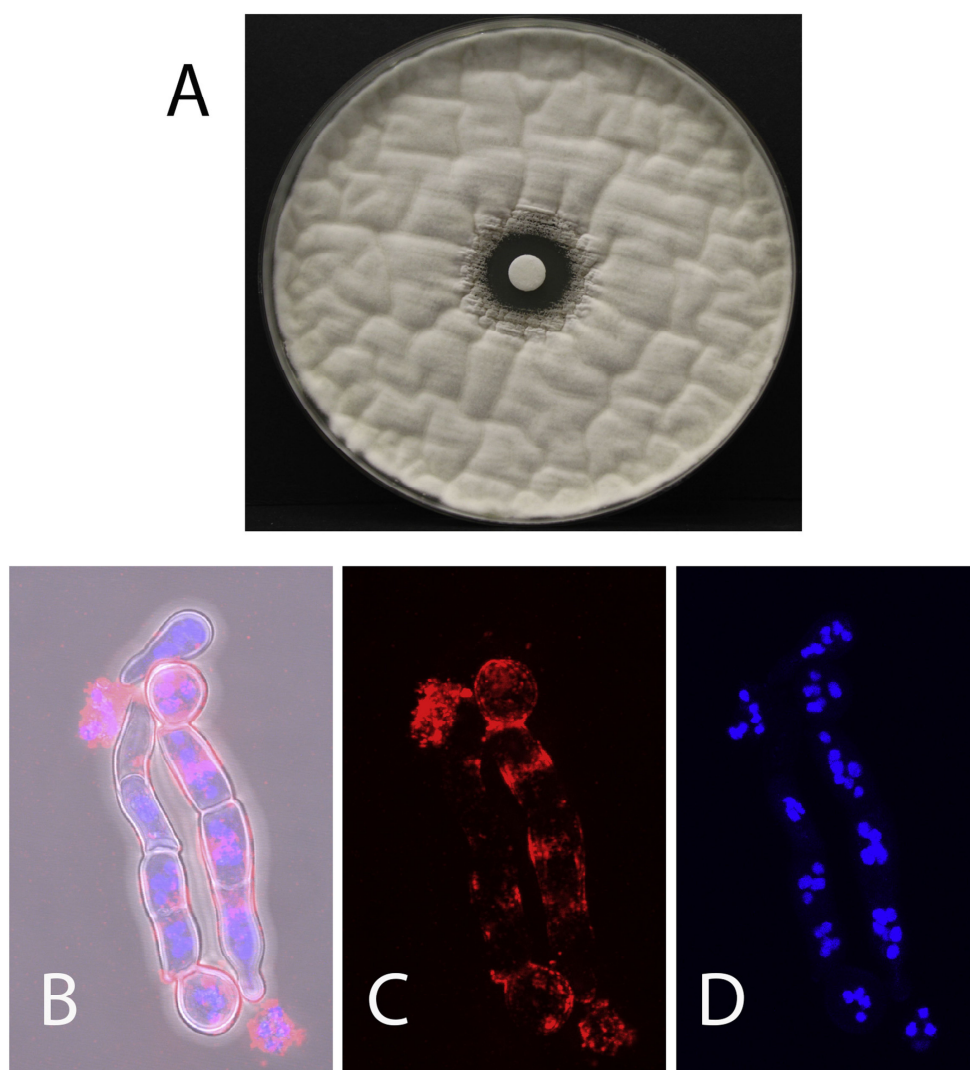


Fig. 2. Impact of iprodione on *A. terreus*. Panel A shows a disk diffusion assay with *A. terreus* strain NIH 2624 and a disk containing 125 µg iprodione. Panel B to D show *A. terreus* germlings treated with 25 µg/ml iprodione for 9 h. An immunofluorescence analysis using the galactomannan-specific antibody L10-1 and a DAPI staining are shown in C and D, respectively. Panel B shows an overlay of C, D and a bright field image.

Table 1

TcsC homologous proteins in molds showing sensitivity to fludioxonil and/or iprodione. The number of HAMP domains was predicted using the SMART algorithm. The percentage of identical amino acids to *A. fumigatus* TcsC was determined using MUSCLE.

Species	Accession number	Number of HAMP domains	Number of amino acids	Identity in%
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Afu2g03560	6	1337	100.0
<i>Aspergillus terreus</i>	CCM66045	6	1348	91.2
<i>Fusarium oxysporum</i>	FOXB_17386	6	1293	68.9
<i>Lichtheimia corymbifera</i>	CDH49117	11	1681	51.2
<i>Rhizopus irregularis</i>	ESA18659.1	9	1555	53.4
<i>Mucor circinelloides</i>	HMPREF1544.08225	7	1141	54.9
<i>Scedosporium apiospermum</i>	KEZ44374	6	1288	67.1

N-terminal sensing modules that, according to the SMART algorithm, contained 6 to 11 HAMP domains.

In the following experiments, we used *A. fumigatus* as a model organism to study the impact of fludioxonil in more detail. At

the beginning of this study, it was already known that fludioxonil causes a massive swelling of hyphal cells, which may eventually culminate in lysis (McCormick et al., 2012). To analyze whether such a treatment finally results in a quantitative killing, we culti-

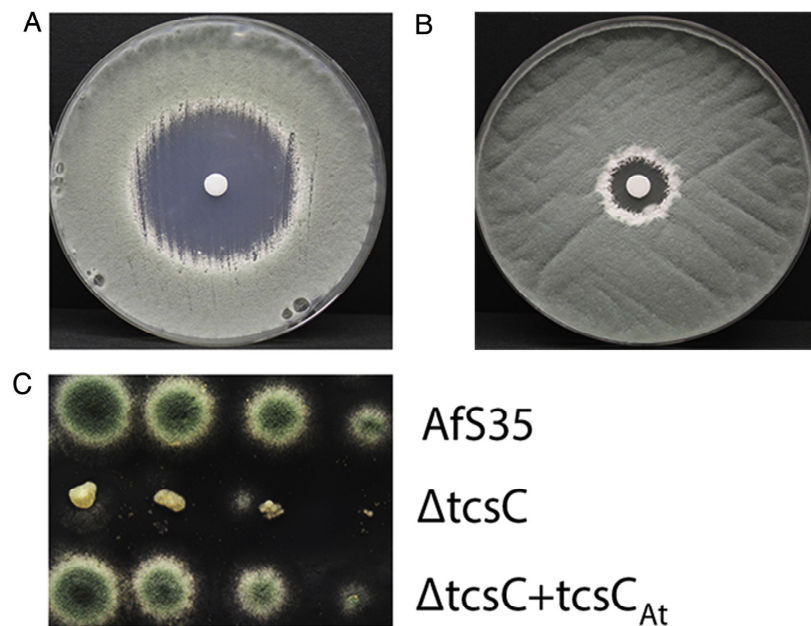


Fig. 3. Expression of the *A. terreus* *tcsC* in an *A. fumigatus* $\Delta tcsC$ mutant. Expression of *A. terreus* *tcsC* (*tcsC_{At}*) restored sensitivity to fludioxonil and iprodione (panels A and B, respectively). Disks contained 5 μ g fludioxonil and 125 μ g iprodione. Panel C shows a drop dilution assay on an AMM plate containing 1.2 M sorbitol. Afs35 is the parental strain of the $\Delta tcsC$ mutant.

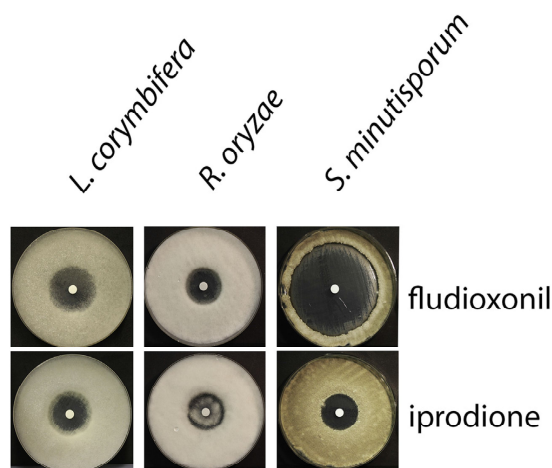


Fig. 4. Impact of fludioxonil (5 μ g per disk) and iprodione (125 μ g per disk) on growth of *Lichtheimia corymbifera*, *Rhizopus oryzae* and *Scedosporium minutisporum*. Plates were incubated at 30 °C.

vated *A. fumigatus* in the presence of 1 μ g/ml fludioxonil for several days. To directly visualize lysis, we used a strain expressing cytosolic GFP. After 72 h, most hyphal compartments were completely lysed and the weak GFP signals found in few compartments indicate substantial membrane damage (Fig. 5). This demonstrates that fludioxonil treatment can result in a quantitative lysis of *A. fumigatus* hyphae, at least under *in vitro* conditions.

Time lapsed microscopy revealed that the earliest response of *A. fumigatus* hyphae to fludioxonil is an immediate halt of the hyphal elongation (Fig. 6). This growth arrest clearly precedes the swelling and lasts as long as fludioxonil is present (Fig. 6 and data

not shown). To analyze whether this growth inhibition reflects a disorganization of the whole cellular machinery, we treated an *A. fumigatus* strain in which mitochondria are labelled by targeted GFP expression. After treatment with 1 μ g/ml fludioxonil for 8 h, hyphae were analyzed by live cell imaging. Video S1 in the online version at DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2016.09.005> demonstrates that the dramatically swollen compartments retained a dynamic mitochondrial network until lysis.

We have previously reported that fludioxonil triggers an increase in the number of nuclei per compartment (McCormick et al., 2012). To visualize nuclei in *A. fumigatus*, we constructed a strain expressing a GFP fused to the C-terminal 156 amino acids of the StuA protein (Afu2g07900). As previously described for *A. nidulans* (Suelmann et al., 1997), this fusion protein accumulates in the nucleus during interphase, but translocates to the cytoplasm during mitosis (data not shown). Live cell imaging of an *A. fumigatus* strain expressing GFP-StuA_{NLS} demonstrated that early after addition of fludioxonil, the nuclei were arranged in a regular pattern along the central hyphal axis (data not shown), but this orderly pattern dissolved after 90 min (Video S2 in the online version at DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2016.09.005>). In normal hyphae, mitosis is tightly controlled and restricted to the apical compartments (Shen et al., 2014), but in fludioxonil-treated hyphae, mitosis occurred in all compartments (Video S2 and data not shown in the online version at DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2016.09.005>).

A. fumigatus hyphae treated with fludioxonil for 6 h or longer contain increased numbers of nuclei and possess more septa than normal. Septum formation is a tightly controlled process and linked to mitosis. It was shown in *A. nidulans* that before mitosis occurs, apical compartments transiently close their septal pores to disconnect themselves from the rest of the hypha. This is accompanied by a re-localization of the kinase NimA from the septal pore to the nuclei (Shen et al., 2014). When expressed in *A. fumigatus* hyphae, NimA-GFP was found in patches in the central part of the septal cross wall (Fig. 7B). In fludioxonil-treated hyphae this distinct

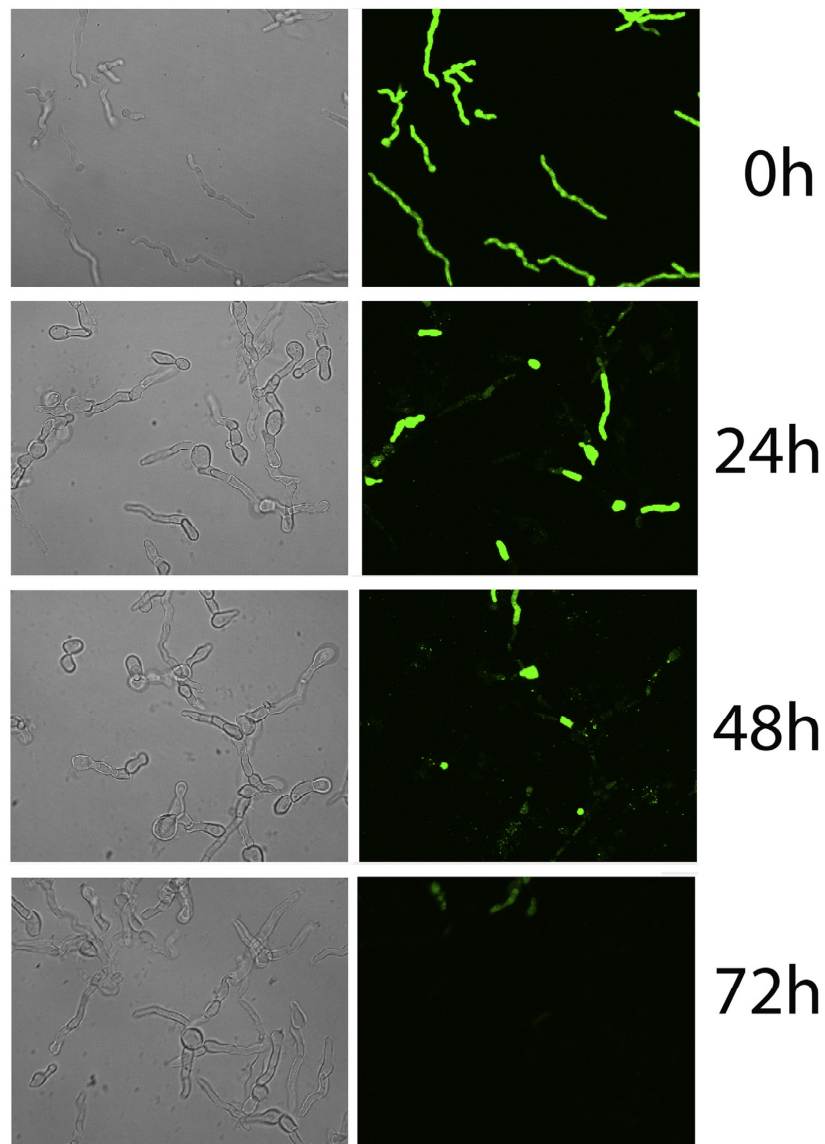


Fig. 5. Fludioxonil treatment leads to a quantitative lysis. *A. fumigatus* hyphae expressing cytosolic GFP were treated with fludioxonil (1 $\mu\text{g/ml}$) for up to 72 h. At time point zero, all hyphae showed a strong and homogenous GFP fluorescence. After 72 h, only weak fluorescence was still detectable in few compartments. Bright field images show the characteristic swelling and damage of hyphae due to fludioxonil treatment.

localization of NimA-GFP was no longer detectable (Fig. 7D), which suggests that these septal pores have been closed. FRAP analysis of an *A. fumigatus* strain expressing cytosolic GFP confirmed this: After 6 h of fludioxonil treatment 24 out of 25 septa were closed, whereas in control hyphae 21 out of 25 septa were open.

The fungal cell wall is a highly dynamic entity that responds to different types of stress often by a structural reorganization (Dichtl et al., 2016). The swelling induced by fludioxonil applies a physical stress to the cell wall. To investigate the consequences, we analyzed *A. fumigatus* hyphae treated with 1 $\mu\text{g/ml}$ fludioxonil for 10 h. Calcofluor white staining revealed that the chitin levels

in fludioxonil-treated hyphae are clearly higher than in the corresponding controls (Suppl. Fig. S4 in the online version at DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2016.09.005>). A parallel staining for galactomannan revealed an even more striking effect: In normal hyphae, galactomannan is homogeneously distributed over the surface (Fig. 8, 0 h), but 6 h after addition of fludioxonil, only weak galactomannan-specific signals were left and their distribution on the hyphal surface changed to a speckled pattern (Fig. 8). At this time, many small, galactomannan-positive spots appeared as a kind of halo around the hyphae (Fig. 8, 6–10 h) suggesting that swollen, fludioxonil-treated hyphae shed large quantities of their galac-

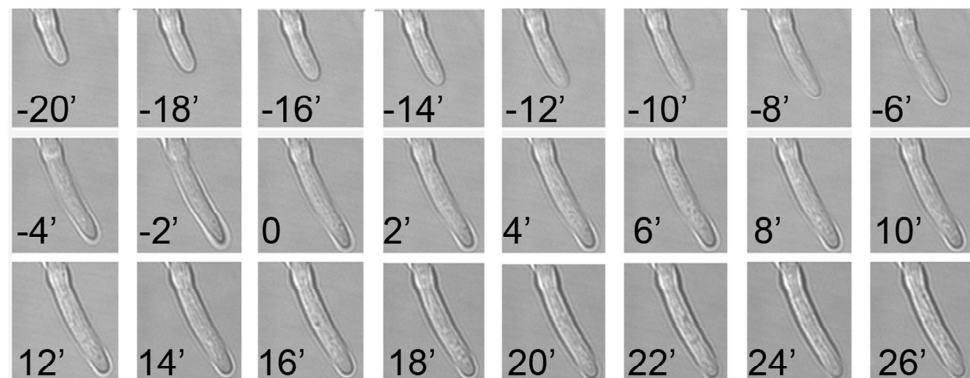


Fig. 6. Fludioxonil induces an immediate growth arrest in *A. fumigatus* hyphae. The tip of a representative hypha is followed by live cell microscopy. Images were taken every two minutes before and after addition of 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ fludioxonil (time point 0). Note that the hyphal growth stops immediately and remains in an arrested state until the end of the experiment.

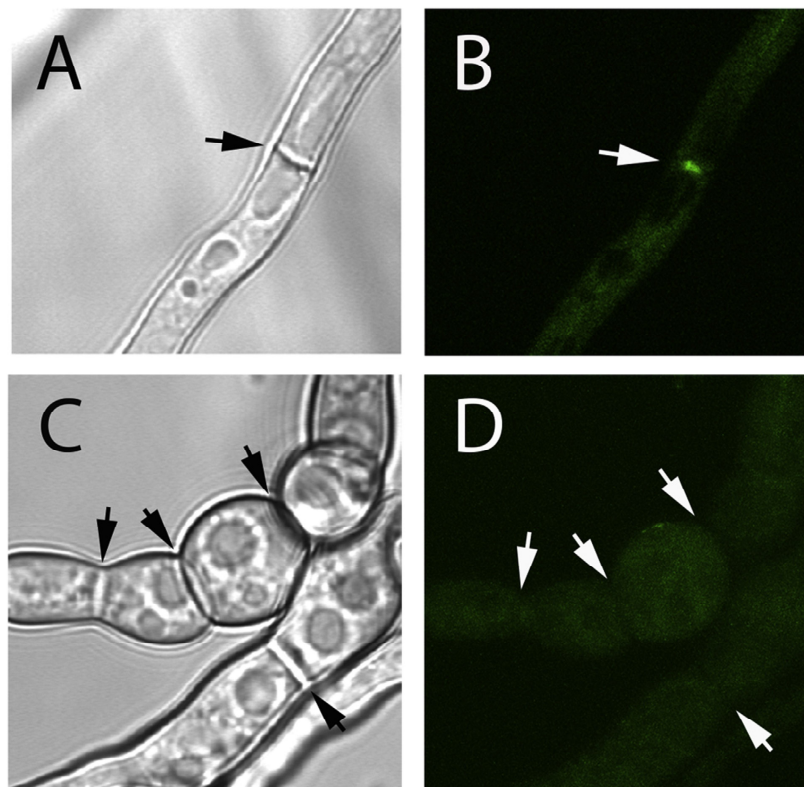


Fig. 7. Localisation of NimA-GFP. Fluorescence micrographs of control hyphae and hyphae treated with 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ fludioxonil for 8 h are shown in panel B and D, respectively. The corresponding bright field images are depicted in A and C. The positions of septa are indicated by arrows.

tomannan antigen. To investigate this further, we quantified the amounts of galactomannan in culture supernatants. Fig. 9 shows that fludioxonil-treatment indeed results in an increased release of galactomannan. This shedding of galactomannan in response to fludioxonil or iprodione is not specific for *A. fumigatus*, but was also observed with other *Aspergillus* species including *A. terreus* treated with iprodione (Fig. 2C and data not shown).

3. Discussion

The outcome of invasive fungal infections is often poor, due to suboptimal diagnostics, limited therapeutic options, increasing resistance to azoles and breakthrough infections caused by intrinsically resistant fungi (Kontoyiannis and Lewis, 2014; Shor and Chauhan, 2015). New therapeutic options are therefore clearly

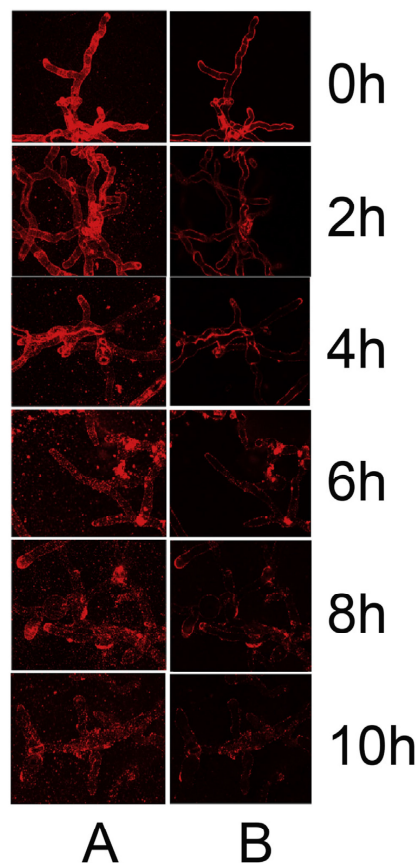


Fig. 8. Fludioxonil treatment results in a loss of surface accessible galactomannan. Hyphae of *A. fumigatus* were treated with fludioxonil (1 µg/ml) for the times indicated. Galactomannan was subsequently stained using monoclonal antibody L10-1. Column A shows maximum projections of confocal stacks, column B shows corresponding single optical planes.

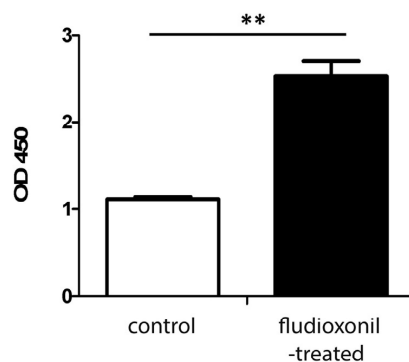


Fig. 9. Release of galactomannan induced by fludioxonil. Hyphae of *A. fumigatus* strain D141 were grown overnight at 30 °C. Three wells were treated with 2 µg/ml fludioxonil. The supernatants of the controls were harvested at time point zero, whereas the other supernatants were collected 24 h after addition of fludioxonil. Standard deviations are indicated. **: p-value = 0.001.

required and should ideally be safe, efficient and suitable for treatment of a broad range of fungal pathogens.

Substances that activate the HOG-pathway are known for some time, but so far their use is limited to the treatment of certain fungal infections in plants. These agents target type III HHK, which are found in many fungi including molds (Defosse et al., 2015). The absence of homologous proteins in humans and other mammals and the fact that biochemically diverse agents, like fludioxonil and iprodione, activate type III HHK, should facilitate an identification of compounds that lack severe side effects (Shor and Chauhan, 2015). In light of the actual problems in antifungal therapy, HOG-activating agents are therefore an interesting option that is worth being considered.

The sole type III HHKs of *A. nidulans* and *A. fumigatus* have been designated NikA and TcsC, respectively and deletions of the corresponding genes resulted in complete resistance to fludioxonil and iprodione (Hagiwara et al., 2007, 2013; McCormick et al., 2012). In this study, we show that fludioxonil has a similar antifungal effect on *A. niger*, *A. oryzae* and *A. flavus*, but not on *A. terreus*. The striking resistance of *A. terreus* is of clinical importance, since *A. terreus* is the second most relevant pathogen of the genus *Aspergillus* and often shows a poor response to common antifungal therapies (Pastor and Guarro, 2014). The data base entry of the TcsC protein of *A. terreus* suggested a truncated protein, but re-sequencing of the corresponding gene revealed a gene that is likely to encode a fully functional type III HHK. This was corroborated by two facts: (i) *A. terreus* can well adapt to high osmotic conditions and (ii) iprodione treatment causes the same phenotype as in *A. fumigatus*. Based on these data we assumed that the TcsC kinase of *A. terreus* is functional and in order to test this, we expressed the *A. terreus* gene in an *A. fumigatus* Δ tcsC mutant. The resulting strain regained its ability to grow under high osmotic conditions and showed sensitivity to iprodione and fludioxonil, a phenotype that clearly differs from the fludioxonil resistance of the *A. terreus* wild type. This may be due to the fact that *A. terreus* tcsC is expressed in *A. fumigatus* using the relatively strong *gpdA* promoter. However, other differences between *A. terreus* and *A. fumigatus* may exist and be responsible for the different sensitivity to fludioxonil, for example a reduced uptake or a faster efflux of fludioxonil in *A. terreus*. In this context it is remarkable that *A. terreus* showed a limited sensitivity to fludioxonil, but only in the initial growth phase. This transient inhibition points to an adaptation process that can result in full resistance, e.g. by the activation of efflux pumps. The fact that iprodione inhibits growth and causes lysis of *A. terreus* hyphae indicates that the resistance mechanism operating in this organism is able to neutralize fludioxonil, but not iprodione. This may be due to biochemical differences between both compounds. The sensitivity of *A. terreus* to iprodione demonstrates that activation of type III HHK is a strategy that can, in principle, also be employed to combat *A. terreus*.

Fludioxonil and/or iprodione have been shown to be active against *Neurospora crassa* and *Aspergillus nidulans* (Ochiai et al., 2001; Hagiwara et al., 2007) as well as plant-pathogens like *Fusarium oxysporum* (Rispaill and Di Pietro, 2010). Similar effects have been reported for the human pathogens *Candida albicans* (Ochiai et al., 2002), *Cryptococcus neoformans* (Kojima et al., 2006) and *A. fumigatus* (McCormick et al., 2012). Non-*Aspergillus* molds, like *Lichtheimia*, *Rhizopus*, *Fusarium* and *Scedosporium*, are emerging pathogens with an increasing clinical relevance (Douglas et al., 2016). In this study, we demonstrate that *Lichtheimia*, *Rhizopus* and *Scedosporium* are also sensitive to fludioxonil and iprodione. For all *Scedosporium* strains tested, fludioxonil treatment resulted in unusually large inhibition zones. This is remarkable, since the rare, but severe infections caused by these pathogens are particularly difficult to treat. Thus, HOG-activating agents show antifungal activity against a broad spectrum of pathogenic molds, which often pose a challenge for therapy.

It has been known for some time that agents that activate type III HHKs cause a dramatic swelling due to a dysregulation of the internal osmotic pressure (Okada et al., 2005). In *A. fumigatus*, the resulting swollen compartments contain unusually large numbers of nuclei (McCormick et al., 2010) indicating that HOG-activating agents have an impact on several aspects of the fungal biology. In this study, we used *A. fumigatus* as a model organism to further investigate the cell biological consequences of the fludioxonil-mediated activation of TcsC. In normal hyphae, nuclei are positioned in a regular array along the central hyphal axis, but after fludioxonil treatment, this order becomes distorted and the nuclei form clusters and move within the cytosol. In normal hyphae, mitosis is restricted to the apical compartments and takes place only if a critical volume has been reached (Fiddy and Trinci, 1976). After fludioxonil treatment, mitosis took place in all hyphal compartments and this was accompanied by a closure of most septal pores. Consistently, we found that in fludioxonil-treated hyphae, the NimA protein is, no longer found at the septum during interphase, where this kinase is normally positioned to keep the septal pore open (Shen et al., 2014). Apparently, the tight control mechanisms that govern mitosis in normal hyphae no longer operate in fludioxonil-treated cells. However, septation and mitosis are still coupled, since mitosis was regularly followed by the formation of a new septum leading to the highly fragmented, swollen hyphae that are characteristically found after fludioxonil-treatment. In these hyphae, most septal pores are closed, resulting in compartments that are no longer controlled by mechanisms normally maintaining a coordinated hyphal organization.

Strikingly, fludioxonil or iprodione cause an immediate growth arrest that clearly precedes the cellular swelling and depends on TcsC. The resulting paralyzed hyphae remain viable and show normal mitochondrial dynamics until lysis. Thus, agents that activate TcsC have an immediate fungistatic effect. Moreover, after longer exposure they are also able to cause a nearly complete lysis. In the few compartments that retained their GFP fluorescence, the signals were much weaker than in control hyphae, indicating that these cells were also damaged. It will be interesting to test whether the remaining swollen cells are more prone to an attack by the host immune system.

A pharmacological activation of type III HHK triggers the HOG pathway, which in turn activates enzymes that produce glycerol and thereby increase the internal osmotic pressure. This results in an influx of water, a cellular swelling and consequently an expansion of the cell wall. Yeasts and fungi usually respond to such a mechanical stress with an enhanced incorporation of chitin into their cell wall (Popolo et al., 1997; Ram et al., 2004). Calcofluor white staining of fludioxonil-treated *A. fumigatus* hyphae provided evidence for such an enhanced chitin incorporation. Unexpectedly, we also observed a simultaneous release of galactomannan. Interestingly, we have recently observed a similar phenotype for an *A. fumigatus* *fls1* mutant lacking the major cell wall component β -1,3 glucan (Dichtl et al., 2015). HOG-activating agents and the absence of β -1,3 glucan both weaken the cell wall and result in frequent lysis. In this situation, shedding of galactomannan may somehow stabilize the expanded cell wall and thereby provide an advantage for the fungus. Hence, our data demonstrate that activators of type III HHK represent an attractive therapeutic option to combat mold infections and may also be instrumental to establish a more sensitive galactomannan-based diagnostics of *Aspergillus* infections.

4. Material and methods

4.1. Media and strains

The following strains were used in this study: *A. fumigatus* wild type strain D141, *A. niger* DSM 737, *A. nidulans* FGSC A26,

the *A. terreus* strains NIH2624, SBUG844 and T9 (kindly provided by Matthias Brock (Nottingham) and Cornelia Lass-Flörl (Innsbruck)), *Lichtheimia corymbifera* (ATCC 46771), *Rhizopus oryzae* (DSM 1185), *Pseudoallescheria boydii* (strain 01-0715), *Scedosporium minutisporum* (strain 01-0564), *S. aurantiacum* (strain 07-0433), *S. apiospermum* (strain 08-0118.01) and *S. prolificans* (strain 95-1482/D361) (kindly provided by Kathrin Tintelnot (Berlin) and Kerstin Voigt (Jena)). The Δ tcsC mutant, the parental strain AfS35, the corresponding complemented strain and the *A. fumigatus* strains expressing cytosolic GFP and GFP with a mitochondrial targeting sequence (mitoGFP) have been described previously (McCormick et al., 2010, 2012).

For isolation of conidia, *A. fumigatus* was grown on Aspergillus Minimal Medium (AMM) agar in tissue culture flasks (Sarstedt, Nümbrecht, Germany). Conidia were harvested using glass beads and sterile water. All other fungi were grown on Sabouraud agar. Conidial suspensions were passed through two layers of Miracloth (Merck, Darmstadt, Germany) to remove debris and larger fungal fragments and the spore concentration was determined using a Neubauer chamber.

4.2. Sequence analysis

Sequence alignments were performed using MUSCLE (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle>) (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>). Protein domains were predicted using SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) (<http://smart.embl-heidelberg.de/>). Localization of proteins was analyzed using WoLF PSORT (<http://www.genscript.com/wolf-psort.html>) (<http://www.genscript.com/wolf-psort.html>). The genome data base of *Aspergillus terreus* was analyzed at http://fungi.ensembl.org/Aspergillus_terreus/Info/Index.

4.3. Disk diffusion assay

The desired number of conidia was homogenously spread on a Sabouraud plate on which one or more paper disks were placed containing the indicated amounts of fludioxonil or iprodione (dissolved in either ethanol or DMSO). Plates were incubated at the indicated temperature until a clear inhibition zone became visible.

4.4. Expression of the GFP fusion proteins

We used WoLF PSORT to predict the minimal C-terminal motif of StuA (Afu2g07900) that is able to target GFP to the nucleus. This motif was identified as the C-terminal 156 amino acids of StuA. The corresponding fragment was amplified from chromosomal DNA using the Q5 High Fidelity Polymerase (New England Biolabs) and the primers GFP-StuA-FOR (GATGTCCTACACCTACACCA) and GFP-StuA-REV (TCATCGACGACGAGGCAT). The resulting blunt-end fragment was subsequently cloned into the EcoRV site of pSK379sGFP. To generate a NimA-GFP fusion, the *nimA* gene (Afu6g02670) was amplified from chromosomal DNA of *A. fumigatus* strain D141 using the Q5 High Fidelity Polymerase and the primer combination NimA-FOR (ATGGCAATTGCTTTGCTGAGG) and NimA-REV (TCCCTGAAGTTTCGAATGACCT). The resulting blunt-end fragment was subsequently cloned into the *PmeI* site of pSK379sGFP. The resulting plasmids were verified by sequencing and then used for transformation of protoplasts of *A. fumigatus* strain AfS35.

4.5. Expression of the *A. terreus* *tcsC* gene in an *A. fumigatus* Δ tcsC mutant

The *tcsC* gene was amplified from chromosomal DNA of *A. terreus* NIH2624 using the Q5 High Fidelity Polymerase

and the primer combination At-tcsC-FOR (ATGGCTGGCGCGGAC-GAAACGCTCGCG) and At-tcsC-REV (TTAGCGGAAGGGCGTGCT-GCGTTTACCCTCT). The PCR product was then cloned into the *PmeI* site of pSK379 (kindly provided by Sven Krappmann, Erlangen). The resulting plasmid was verified by sequencing and then used for transformation of protoplasts of *A. fumigatus* strain AfS35. The chromosomal *tcsC* gene of the resulting strain was subsequently deleted as described previously (McCormick et al., 2012).

4.6. Immunofluorescence and live cell imaging

Hyphae were grown on glass cover slips in AMM. Samples were fixed with 3.7% formaldehyde/PBS for 5 min, washed and subsequently incubated with the galactomannan-specific monoclonal antibody L10-1 (Heesemann et al., 2011) for 30 min at 37°. Cover slips were then washed three times with PBS and subsequently incubated with a Cy3-labelled anti-mouse antibody (Dianova, Hamburg, Germany). To stain the cell wall for chitin, samples were incubated for 1 min with 1 mg/ml Calcofluor white (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany) at RT. All samples were finally mounted with medium with or without DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Images were taken using a Leica SP-5 confocal laser scanning microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

For live cell imaging, conidia were inoculated in 8-well ibidi-chambers or 60 µ-dishes (ibidi GmbH, Martinsried, Germany) containing AMM. Germ tubes were generated by overnight incubation at 30 °C. Fungi were then further grown at 37 °C to the desired length and samples were analyzed using a Leica SP-5 microscope equipped with an environmental chamber adjusted to 37 °C (Leica Microsystems). For live cell imaging, HOG-activating agents were always dissolved in ethanol.

4.7. Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP)

Hyphae of the AfS35 strain expressing cytosolic GFP were grown overnight at 30 °C in 60 µ-dishes (ibidi GmbH, Martinsried, Germany). The resulting short hyphae were treated for 8 h with fludioxonil (2 µg/ml). A central region in the swollen compartments was then bleached using an excitation wave length of 488 nm until the whole compartment completely lost its fluorescence. If neighbouring compartments retained their fluorescence, the respective septum was classified as closed; a loss of fluorescence in a neighbouring compartment indicated an open septum.

4.8. Detection of galactomannan in culture supernatants

Wells of a 24 well plate containing 1 ml AMM each were inoculated with 1.3×10^5 conidia of *A. fumigatus* strain D141 and grown overnight at 30 °C. On the next day (time point zero) three wells were supplemented with 2 µg/ml fludioxonil and further incubated for another 24 h at 37 °C. Supernatants of these wells and of three control wells (taken at time point zero) were analyzed for galactomannan in a sandwich ELISA as described previously (Wiedemann et al., 2016). In brief, the galactomannan-specific monoclonal antibody L10-1 was coated to the surface of an ELISA well (Greiner bio-one high binding plate, Frickenhausen, Germany) and the EB-A2 conjugate from the Aspergillus Platelia Kit (BIORAD, Marnes-la-Coquette, France) was used for detection. The statistical significance was analyzed using an unpaired Student's *t*-test (<http://www.physics.csbsju.edu/cgi-bin/stats/t-test>).

Acknowledgements

We thank Kirsten Niebuhr-Ebel for critical reading of the manuscript. Strains were kindly provided by Mathias Brock (Uni-

versity of Nottingham), Cornelia Lass-Flörl (Medical University of Innsbruck), Kathrin Tinteln (Robert-Koch-Institute, Berlin) and Kerstin Voigt (University of Jena). This work was supported by the German Center for Infection Research (DZIF) and a grant of the Brigitte und Wolfram Gedek Stiftung.

References

- Azevedo, M.M., Faria-Ramos, I., Cruz, L.C., Pina-Vaz, C., Rodrigues, A.G., 2015. Genesis of azole antifungal resistance from agriculture to clinical settings. *J. Agric. Food Chem.* 63, 7463–7468.
- Bahn, Y.S., 2008. Master and commander in fungal pathogens: the two-component system and the HOG signaling pathway. *Eukaryot. Cell* 7, 2017–2036.
- Cortez, K.J., Roilides, E., Quiroz-Telles, F., Meletiadis, J., Antachopoulos, C., Knudsen, T., Buchanan, W., Milanovich, J., Sutton, D.A., Fothergill, A., Rinaldi, M.G., Shea, Y.R., Zaoutis, T., Kottlil, S., Walsh, T.J., 2008. Infections caused by *Scedosporium* spp. *Clin. Microbiol. Rev.* 21, 157–197.
- Defosse, T.A., Sharma, A., Mondal, A.K., Dugé de Bernonville, T., Latgé, J.P., Calderone, R., Giglioli-Guivarc'h, N., Courdavault, V., Clastre, M., Papon, N., 2015. Hybrid histidine kinases in pathogenic fungi. *Mol. Microbiol.* 95, 914–924.
- Dichtl, K., Samantaray, S., Aimanian, V., Zhu, Z., Prévost, M.C., Latgé, J.P., Ebel, F., Wagener, J., 2015. *Aspergillus fumigatus* devoid of cell wall β -1,3-glucan is viable, massively sheds galactomannan and is killed by septum formation inhibitors. *Mol. Microbiol.* 95, 458–471.
- Dichtl, K., Samantaray, S., Wagener, J., 2016. Cell wall integrity signaling in human pathogenic fungi. *Cell. Microbiol.* 18, 1228–1238.
- Douglas, A.P., Chen, S.C., Slavin, M.A., 2016. Emerging infections caused by non-*Aspergillus* filamentous fungi. *Clin. Microbiol. Infect.* 16, 00027–36. pii: S1198-743X.
- Fiddy, C., Trinci, A.P., 1976. Mitosis, septation, branching and the duplication cycle in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* 97, 169–184.
- Hagiwara, D., Matsubayashi, Y., Marui, J., Furukawa, K., Yamashino, T., Kanamaru, K., Kato, M., Abe, K., Kobayashi, T., Mizuno, T., 2007. Characterization of the *NikA* histidine kinase implicated in the phosphorelay signal transduction of *Aspergillus nidulans*, with special reference to fungicide responses. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71, 844–847.
- Hagiwara, D., Takahashi-Nakaguchi, A., Toyotome, T., Yoshimi, A., Abe, K., Kamei, K., Gono, T., Kawamoto, S., 2013. *NikA/TcsC* histidine kinase is involved in conidiation, hyphal morphology, and responses to osmotic stress and antifungal chemicals in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS One* 8, e80881.
- Heesemann, L., Kotz, A., Echtenacher, B., Broniszewska, M., Routier, F., Hoffmann, P., Ebel, F., 2011. Studies on galactofuranose-containing glycostructures of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. *Int. J. Med. Microbiol.* 301, 523–530.
- Kojima, K., Takano, Y., Yoshimi, A., Tanaka, C., Kikuchi, T., Okuno, T., 2004. Fungicide activity through activation of a fungal signalling pathway. *Mol. Microbiol.* 53, 1785–1796.
- Kojima, K., Bahn, Y.S., Heitman, J., 2006. Calcineurin, Mpk1 and Hog1 MAPK pathways independently control fludioxonil antifungal sensitivity in *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology* 152, 591–604.
- Kontoyiannis, D.P., Lewis, R.E., 2014. Treatment: principles for the management of mold infections. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 5, pii: a019737.
- McCormick, A., Heesemann, L., Wagener, J., Marcos, V., Hartl, D., Loeffler, J., Heesemann, J., Ebel, F., 2010. NETs formed by human neutrophils inhibit growth of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. *Microbes Infect.* 12, 928–936.
- McCormick, A., Jacobsen, I.D., Broniszewska, M., Beck, J., Heesemann, J., Ebel, F., 2012. The two-component sensor kinase *TcsC* and its role in stress resistance of the human-pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. *PLoS One* 7, e38262.
- Ochiai, N., Fujimura, M., Motoyama, T., Ichihashi, A., Usami, R., Horikoshi, K., Yamaguchi, I., 2001. Characterization of mutations in the two-component histidine kinase gene that confer fludioxonil resistance and osmotic sensitivity in the os-1 mutants of *Neurospora crassa*. *Pest Manag. Sci.* 57, 437–442.
- Ochiai, N., Fujimura, M., Oshima, M., Motoyama, T., Ichihashi, A., Yamada-Okabe, H., Yamaguchi, I., 2002. Effects of iprodione and fludioxonil on glycerol synthesis and hyphal development in *Candida albicans*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66, 2209–2215.
- Okada, A., Banno, S., Ichihashi, A., Kimura, M., Yamaguchi, I., Fujimura, M., 2005. Pyrrolnitrin interferes with osmotic signal transduction in *Neurospora crassa*. *J. Pest. Sci.* 30, 378–383.
- Pastor, F.J., Guarro, J., 2014. Treatment of *Aspergillus terreus* infections: a clinical problem not yet resolved. *Int. J. Antimicrob. Agents* 44, 281–289.
- Popolo, L., Gilardelli, D., Bonfante, P., Vai, M., 1997. Increase in chitin as an essential response to defects in assembly of cell wall polymers in the ggp1delta mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 179, 463–469.
- Ram, A.F., Arentshorst, M., Damveld, R.A., vanKuyk, P.A., Klis, F.M., van den Hondel, C.A., 2004. The cell wall stress response in *Aspergillus niger* involves increased expression of the glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase-encoding gene (*gfaA*) and increased deposition of chitin in the cell wall. *Microbiology* 150, 3315–3326.

- Rispail, N., Di Pietro, A., 2010. The two-component histidine kinase Fhk1 controls stress adaptation and virulence of *Fusarium oxysporum*. *Mol. Plant Pathol.* 11, 395–407.
- Shen, K.F., Osmani, A.H., Govindaraghavan, M., Osmani, S.A., 2014. Mitotic regulation of fungal cell-to-cell connectivity through septal pores involves the NIMA kinase. *Mol. Biol. Cell* 25, 763–775.
- Shor, E., Chauhan, N., 2015. A case for two-component signaling systems as antifungal drug targets. *PLoS Pathog.* 11, e1004632.
- Suelmann, R., Sievers, N., Fischer, R., 1997. Nuclear traffic in fungal hyphae: in vivo study of nuclear migration and positioning in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* 25, 757–769.
- Wiedemann, A., Kakoschke, T.K., Speth, C., Rambach, G., Ensinger, C., Jensen, H.E., Ebel, F., 2016. Distinct galactofuranose antigens in the cell wall and culture supernatants as a means to differentiate *Fusarium* from *Aspergillus* species. *Int. J. Med. Microbiol.* 306, 381–390, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2016.05.002>.

IV. DISKUSSION

1. Die Notwendigkeit der Entwicklung neuer antifungaler Therapiemöglichkeiten

Die Inzidenz invasiver Mykosen nimmt seit einigen Jahrzehnten immer weiter zu. 1953 wurde zum ersten Mal von einem Patienten berichtet, der an einer invasiven Aspergillose erkrankt war. Genau zu dieser Zeit wurde die Behandlung von Patienten mit Corticosteroiden und zytotoxischen Chemotherapeutika in die medizinische Praxis aufgenommen (RANKIN, 1953). Die Zahl immunsupprimierter Patienten wird durch den medizinischen Fortschritt immer größer, aggressive und intensive Chemotherapien kommen häufig zum Einsatz, um Krebserkrankungen zu bekämpfen und die Anzahl an Organ- und Knochenmarktransplantationen steigt ebenfalls an. Autoimmunerkrankungen werden mit immunsupprimierenden Medikamenten behandelt und auch das Auftreten von HIV und AIDS führte zu einem Anstieg der Anzahl von Patienten mit geschwächtem Immunsystem (LIN et al., 2001). Auch in der Veterinärmedizin können Infektionen mit *Aspergillus* Spezies vielen Tierarten großen Schaden zufügen. Trotz aller Fortschritte in der Entwicklung von antifungalen Therapeutika bleibt die invasive Aspergillose eine gefährliche Infektion, die nur schwer zu therapieren ist.

1.1. Das Problem der Resistenzbildung gegen die Gruppe der Azole

Trotz der steigenden Bedeutung invasiver Mykosen steht nur eine geringe Auswahl geeigneter Therapeutika zur Verfügung. Während der letzten beiden Jahrzehnte haben vor allem zwei Klassen von Antimykotika an Bedeutung gewonnen: Azole, die die Ergosterolsynthese beeinträchtigen und Echinocandine, welche die Synthese von 1,3- β -Glucan hemmen (SHOR & CHAUHAN, 2015). Beide Gruppen stellen wichtige Alternativen zum stärker toxisch wirkenden Polyen Amphotericin B dar.

Schon seit Mitte der 1960er Jahre werden Azole als Fungizide in der Landwirtschaft gegen pflanzenpathogene Pilze eingesetzt. Da *Aspergillus* ubiquitär vorkommt, ist er den Fungiziden zwangsläufig exponiert (MEIS et al., 2016). Es ist bekannt, dass die Anwendung von Azolen über einen langen Zeitraum zur Selektion von resistenten Klonen führen kann (AZEVEDO et al., 2015). Diese Gefahr besteht

nicht nur in der Landwirtschaft, wo Azole flächendeckend und häufig eingesetzt werden, sondern auch in der Humanmedizin. Hier wird die Resistenzentwicklung durch den prophylaktischen Einsatz von Azolen oder durch eine lange Behandlungsdauer gefördert (AZEVEDO et al., 2015).

Da Azole in den meisten Fällen als Ersttherapeutikum eingesetzt werden, ist die Entwicklung von Resistenzen gegen sie von großer medizinischer Relevanz. Es wird angenommen, dass Resistenzen, die in Patienten beobachtet werden und die Entwicklung der Resistenzen beim Gebrauch in der Landwirtschaft in direktem Zusammenhang zueinander stehen (LAXMINARAYAN et al., 2006). Der extensive Gebrauch der Azole in der Landwirtschaft verändert die in der Umwelt vorkommenden Pilzpopulationen dahingehend, dass sensible Spezies weniger werden und die Zahl der resistenten Pilze zunimmt. Da auch humanpathogene Keime von dieser Entwicklung betroffen sind, steigt das Gesundheitsrisiko für den Menschen an (HOF, 2001).

Die Selektion resistenter *A. fumigatus* Klone kann auch Auswirkungen auf das Management der Aspergillose in Tierbeständen haben. Es gibt Berichte aus Belgien und den Niederlanden, in denen *A. fumigatus* Stämme isoliert wurden, die Resistenzen gegen Itraconazol und Voriconazol aufwiesen (BEERNAERT et al., 2009). Dies macht deutlich, dass die Resistenzbildung gegen Azole zukünftig auch in der Veterinärmedizin an Bedeutung gewinnen könnte.

1.2. Neue therapeutische Probleme durch Infektionen mit Nicht-*Aspergillus* Schimmelpilzen

A. fumigatus ist nur einer von vielen pathogenen Pilzen, die immer häufiger auftreten. Infektionen, die von anderen filamentösen Pilzen als *Aspergillus* ausgelöst werden, kommt dabei immer mehr Bedeutung zu. Zu den am häufigsten vorkommenden Nicht-*Aspergillus* Schimmelpilzen gehören *Fusarium* spp., *Mucor* spp., *Rhizopus* spp. und *Scedosporium* spp. (DOUGLAS et al., 2016). Sie spielen vor allem in der Humanmedizin eine große Rolle, da sie schwerwiegende Krankheitsverläufe mit hohen Mortalitätsraten verursachen und teilweise noch schwieriger zu therapieren sind als *Aspergillus*-Infektionen. Außerdem betreffen sie nicht nur Patienten mit geschwächtem Immunsystem, sondern können auch immunkompetente Menschen infizieren (DOUGLAS et al., 2016). *Fusarium* spp. zählen zu den therapieresistentesten Pilzen überhaupt. Sie sind nur wenig sensibel für Fluconazol und Amphotericin B und zeigen eine variable Sensitivität für

Itraconazol, Voriconazol und Posaconazol. Die Echinocandine Caspofungin, Anidulafungin und Micafungin zeigen keine in-vitro Aktivität gegen *Fusarium* spp. (DIGNANI & ANAISSIE, 2004). Mucormykosen, ausgelöst durch Vertreter der Mucorales wie *Rhizopus* spp. oder *Lichtheimia* spp. sind aufgrund ihrer geringen Sensitivität gegenüber einigen Antimykotika ebenfalls schwer zu therapieren. Da diese Pathogene nur teilweise sensibel für Azole sind, bleibt Amphotericin B derzeit der Goldstandard für ihre Behandlung. In manchen Fällen verbessert eine Kombination mit Echinocandinen den Erfolg der Therapie (ALASTRUEY-IZQUIERDO et al., 2010). *Scedosporium* spp. zeigen sich resistent gegenüber Amphotericin B und gegenüber der meisten Vertreter der Echinocandine (CORTEZ et al., 2008). Dies zeigt, dass auch bei Infektionen mit Nicht-*Aspergillus* Schimmelpilzen ein dringender Bedarf an neuen therapeutischen Möglichkeiten besteht.

1.3. Die Typ III Hybrid-Histidin-Kinase TcsC und der HOG-Signalweg als geeigneter Angriffspunkt für die Entwicklung neuer Therapeutika

Ideale Angriffspunkte für Antimykotika sind Proteine, die pilzspezifisch sind, also im Wirtsorganismus nicht vorkommen, als Virulenzfaktoren fungieren und essenziell für das Überleben des Pilzes sind (SHOR & CHAUHAN, 2015). Ein Grund für die geringe Auswahl an antifungalen Therapeutika ist die Tatsache, dass Pilze und Säugetiere evolutionär relativ eng miteinander verwandt sind, weshalb viele potentielle Angriffspunkte auch im Säugetier vorkommen (SHOR & CHAUHAN, 2015). Zwei-Komponenten-Signalwege zeigen sich als geeignete Kandidaten für neue Zielstrukturen, da sie in Prokaryonten, Pflanzen und niederen Eukaryonten vorkommen, aber im Säugetier fehlen. Gene, die für Proteine in Zwei-Komponenten-Signalwegen codieren, sind zwar meist nicht essentiell für das Überleben, es konnte aber gezeigt werden, dass die Deletion solcher Gene Fitnessdefekte, wie reduzierte Pathogenität, verminderte Sporulation und erhöhte Osmosensitivität, hervorrufen kann (KILANI & FILLINGER, 2016).

McCormick *et al.* konnten zeigen, dass die Typ III Hybrid-Histidin-Kinase in *A. fumigatus* essentiell ist für die antifungale Aktivität von Fludioxonil und Iprodion. Im Western Blot konnte eine Hyperphosphorylierung der MAPK SakA unter Fludioxonil und hyperosmolarem Stress für den Wildtyp, aber nicht für die $\Delta tcsC$ Mutante nachgewiesen werden. Das beweist, dass die Phosphorylierung von SakA

eindeutig von TcsC abhängt (MCCORMICK et al., 2012). TcsC ist also ein attraktives Zielprotein für die künstliche Aktivierung des HOG-Signalwegs.

Die Aktivierung des HOG-Signalwegs zieht einige schädigende Auswirkungen auf den Pilz nach sich. Dies zeigt, dass die Aktivierung des HOG-Signalwegs eine zielführende Strategie zur Bekämpfung von Aspergillose ist. Wir konnten nachweisen, dass Fludioxonil einen sofortigen Wachstumsstopp auslöst. Diese erste Reaktion des Pilzes führt also zunächst zu einem fungistatischen Effekt. Wurde ein GFP-exprimierender Stamm aber über 72 h mit Fludioxonil behandelt, war in den meisten Kompartimenten kein Fluoreszenzsignal mehr nachweisbar und wenn dann nur noch sehr schwach. Das zeigt, dass Fludioxonil bei längerer Einwirkung zu einer quantitativen Lyse der kompletten Hyphen führt und dass Kompartimente, die noch nicht lysiert waren, zumindest stark geschädigt wurden. Der fungistatische Effekt der Aktivierung des HOG-Signalwegs kann daher durch längere Inkubation zu einem fungiziden Effekt gesteigert werden (WIEDEMANN & SPADINGER et al., 2016).

Die Tatsache, dass es unter Fludioxonil zu einer unphysiologischen Akkumulation von Zellkernen und einer vermehrten Bildung von Septen kommt, zeigt, dass die Aktivierung des HOG-Signalwegs zu weiteren Störungen biologischer Funktionen des Pilzes führt. Normalerweise finden Mitosen nur im apikalen Kompartiment der Hyphe statt, alle anderen Kompartimente verbleiben in der Interphase. Auch die Septenbildung ist ein streng regulierter Prozess und steht in Verbindung mit der Mitose (SHEN et al., 2014). Um zu erreichen, dass ausschließlich Kerne des apikalen Kompartiments in die Mitose eintreten, muss es zu einem Verschluss der Septenporen kommen, um die apikalen Kompartimente für den Zeitraum der Mitose von den restlichen Hyphen zu trennen. Ein Protein, das mit den Septenporen assoziiert ist, ist die Kinase NimA. Shen *et al.* konnten in *A. nidulans* zeigen, dass NimA während der Interphase am Septum lokalisiert ist und dieses offen hält, während der Mitose aber an die Spindelpolkörper bindet (SHEN et al., 2014). Wir konnten in einer Gendatenbank das homologe NimA aus *A. fumigatus* (Afu6g02670) identifizieren und durch Fusion mit GFP zeigen, dass NimA in unbehandelten wildtypischen Hyphen am Septum zu finden ist. In Fludioxonil behandelten Zellen war diese Lokalisation jedoch nicht mehr nachweisbar, was zeigt, dass die Septenporen geschlossen sind (WIEDEMANN & SPADINGER et al., 2016). Dies konnten wir durch eine FRAP (*fluorescence recovery after photobleaching*) Analyse bestätigen. Hierbei werden einzelne Kompartimente eines

GFP-exprimierenden Stammes durch eine Erhöhung der Laserleistung ausgebleicht und anschließend daraufhin untersucht, ob das GFP-Signal nach kurzer Zeit zurückkehrt. In unbehandelten wildtypischen Hyphen ist die Mehrheit der Septenporen geöffnet und deshalb durchlässig für verschiedene Bestandteile des Zytoplasmas, wie beispielsweise Proteine. Somit kann GFP über die Septenporen in benachbarte Kompartimente gelangen und das Fluoreszenzsignal wird nach dem Ausbleichen wieder sichtbar. In Fludioxonil behandelten Zellen bleibt das GFP-Signal nach dem Ausbleichen eines Kompartiments auf die benachbarten Kompartimente beschränkt, die Septenporen sind folglich geschlossen (WIEDEMANN & SPADINGER et al., 2016). Die physiologische Regulation der Mitose und dem Öffnen und Schließen der Septenporen wird durch die Aktivierung des HOG-Signalwegs völlig außer Kraft gesetzt.

Eine weitere charakteristische Folge der Fludioxonil-Behandlung ist ein massiver Verlust von Galaktomannan aus der Zellwand, was wir zunächst durch eine Immunfluoreszenzfärbung mit einem Galaktomannan-spezifischen Antikörper zeigen und anschließend im ELISA bestätigen konnten (WIEDEMANN & SPADINGER et al., 2016). Der Nachweis von Galaktomannan wird auch im PlateliaTM Galactomannan-Assay zur Diagnostik invasiver Aspergillosen verwendet. Die Tatsache, dass unter Fludioxonil Galaktomannan vermehrt freigesetzt wird, könnte für eine Erhöhung der Sensitivität der Galaktomannan gestützten Diagnostik genutzt werden.

Fludioxonil ist neben Keimlingen und Hyphen auch auf ruhende Konidien wirksam. Ähnlich wie Hyphen schwellen Konidien an, zeigen einen Verlust von Galaktomannan aus der Zellwand und eine Proliferation der Zellkerne (unpublizierte Daten). Dass eine antifungale Substanz auch ruhende Konidien schädigt, ist ein wichtiger Aspekt, da diese sonst ungehindert auskeimen könnten, wenn der Wirkstoff entfernt wird.

Fludioxonil ist wirksam gegen *A. fumigatus*, *A. nidulans* (MCCORMICK et al., 2012), *A. flavus* und *A. niger*, *A. terreus* hingegen ist resistent (WIEDEMANN & SPADINGER et al., 2016). Nach der in der Gendatenbank vorhandenen Sequenz ist das TcsC von *A. terreus* unvollständig und somit sehr wahrscheinlich nicht funktionell. *A. terreus* ist aber in der Lage, sich an osmotischen Stress anzupassen, es muss somit eine Möglichkeit geben, den HOG-Signalweg zu aktivieren. Die Resequenzierung des TcsC-Gens im wildtypischen Stamm NIH2624 zeigte schließlich, dass TcsC in *A. terreus* zwar einige Unterschiede zu TcsC in *A.*

fumigatus aufweist, ansonsten aber komplett ist. Durch Klonierung und Expression des TcsC von *A. terreus* in einer *A. fumigatus* $\Delta tcsC$ Mutante konnten wir zeigen, dass dieses Protein funktionell ist, da es in der Lage ist, die *A. fumigatus* $\Delta tcsC$ Mutante zu komplementieren und somit die Sensitivität für Fludioxonil und die Anpassungsfähigkeit an hyperosmolaren Stress wiederherstellt (WIEDEMANN & SPADINGER et al., 2016). In diesem Zusammenhang ist interessant, dass *A. terreus* sensibel gegenüber Iprodion ist. Da die Wirkung von Iprodion über Typ III Hybrid-Histidin-Kinasen vermittelt wird, muss es Gründe unabhängig von TcsC geben, die *A. terreus* resistent gegenüber Fludioxonil werden lassen. Eine mögliche Erklärung wäre, dass Fludioxonil aufgrund einer *multi drug resistance* (MDR) unwirksam gegen *A. terreus* ist. An diesem Resistenzmechanismus sind beispielsweise ABC (*ATP binding cassette*) Transporter beteiligt (COLE et al., 1992). ABC-Transporter gehören zu den primär aktiven Transportern, die meisten dieser Transportproteine sind für den Export toxischer Substanzen zuständig (SAIER, 2000). In *Botrytis cinerea* wurden bereits einige ABC-Transporter identifiziert, deren Expression durch Fludioxonil induziert wird. Werden die Gene für diese ABC-Transporter deletiert, reagieren die entsprechenden Mutanten sensibler auf Fludioxonil als die Ausgangsstämme. Dies zeigt, dass die Expression von ABC-Transportern zu einer Fludioxonil-Resistenz führen kann (SCHOONBEEK et al., 2003). Es wäre daher denkbar, dass auch in *A. terreus* ein Export über ABC-Transporter für die Fludioxonil-Resistenz verantwortlich ist. Da aber Iprodion auch in *A. terreus* zu einer Aktivierung des HOG-Signalwegs führt, scheint diese Substanz nicht betroffen zu sein.

Wir konnten zeigen, dass neben *Aspergillus* spp. auch Nicht-*Aspergillus* Schimmelpilze wie *Lichtheimia corymbifera*, *Rhizopus oryzae* und *Scedosporium minutisporum* sensibel für Fludioxonil und Iprodion sind (WIEDEMANN & SPADINGER et al., 2016). Infektionen durch diese Pathogene lösen schwere Krankheitsverläufe aus und sind oft nur schwer zu therapieren. Die Aktivierung des HOG-Signalwegs könnte folglich eine geeignete Strategie sein, um ein breites Spektrum an pathogenen Schimmelpilzen zu bekämpfen.

2. Hybrid-Histidin-Kinasen als positive oder negative Regulatoren des HOG-Signalwegs

Der HOG-Signalweg wurde ursprünglich in der Modell-Hefe *Saccharomyces cerevisiae* entdeckt und charakterisiert. Im Gegensatz zu den meisten Pilzen besitzt diese Hefe keine Typ III, sondern eine Typ VI Hybrid-Histidin-Kinase. Die Typ VI Hybrid-Histidin-Kinase Sln1 in *S. cerevisiae* ist neben dem Phosphotransfer-Protein Ypd1, dem Response-Regulator Ssk1 und dem MAPK-Modul Bestandteil des HOG-Signalwegs (HOHMANN, 2009). Es wurde gezeigt, dass Sln1 unter normalen osmotischen Bedingungen als Kinase aktiv ist und hyperosmotischer Stress Sln1 inaktiviert (POSAS et al., 1996). Daraus folgt, dass Sln1 aktiv, also phosphoryliert sein muss, um den HOG-Signalweg in inaktivem Zustand zu halten, umgekehrt muss Sln1 nicht-phosphoryliert sein, um eine Phosphorylierung der MAPK Hog1 zu ermöglichen. Sln1 ist folglich ein negativer Regulator des HOG-Signalwegs. Die Phosphorylierungskaskade, beginnend bei Sln1 und endend bei Hog1, muss daher auf Höhe eines der dazwischenliegenden Proteine unterbrochen werden. Maeda *et al.* konnten zeigen, dass die Aktivität von Sln1 unter hyperosmotischen Bedingungen unterdrückt wird und die daraus folgende Akkumulation des nicht phosphorylierten Response-Regulators Ssk1 zu einer Aktivierung des nachgeschalteten MAPK-Moduls führt (MAEDA et al., 1994). Dies ist schematisch in Abbildung 10 gezeigt.

Wird nun solch ein negativer Regulator des HOG-Signalwegs deletiert, hat das letale Folgen für die resultierende Mutante, da in diesem Fall der HOG-Signalweg unkontrolliert aktiv ist. Um dieses Problem bei funktionellen Studien zu umgehen, wurde eine temperaturabhängige $\Delta sln1$ Mutante hergestellt. Diese trägt ein Temperatur-sensitives Sln1 Allel, welches bei 37 °C nicht mehr exprimiert wird (MAEDA et al., 1994). Dieses System wurde für die heterologe Expression einiger Typ III Hybrid-Histidin-Kinasen aus anderen Hefen genutzt. DhNik1 aus der osmotoleranten Hefe *Debaromyces hansenii* und Clnik1 aus *Candida lusitanae* konnten so ebenfalls als negative Regulatoren des HOG-Signalwegs identifiziert werden, da sie in der Lage sind, die $\Delta sln1$ Mutante zu komplementieren (MEENA et al., 2010; RANDHAWA et al., 2016).

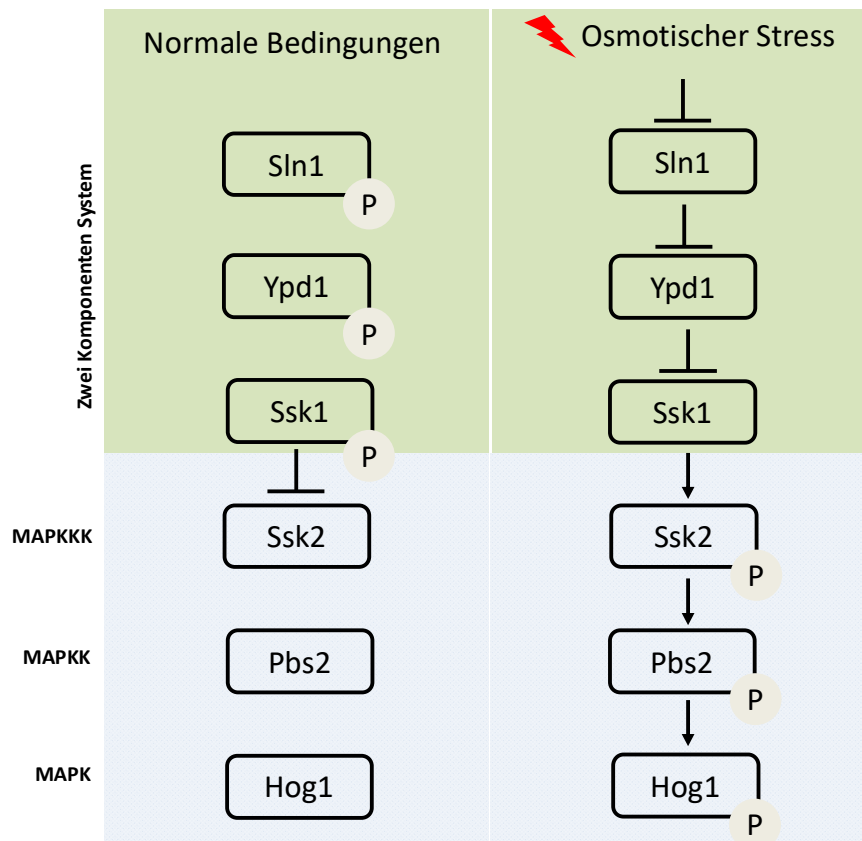


Abbildung 10: Modell der negativen Regulation des HOG-Signalwegs durch die Hybrid-Histidin-Kinase Sln1 in *S. cerevisiae*

Positive Regulatoren des HOG-Signalwegs sind Typ III Hybrid-Histidin-Kinasen, die unter normalen osmotischen Bedingungen inaktiv sind und erst durch externe Stresssignale aktiviert werden. Die Aktivität der Kinase wird nicht benötigt, um den HOG-Signalweg inaktiv zu halten. In einem solchen Fall ist der HOG-Signalweg eine lineare Signalkaskade. In filamentösen Pilzen konnten einige vitale Deletionsmutanten von Typ III Hybrid-Histidin-Kinasen hergestellt werden. Dies lässt darauf schließen, dass die entsprechenden Kinasen unter normalen Bedingungen inaktiv sind und erst durch externe Stresssignale aktiviert werden. Somit liegt nahe, dass es sich in diesen Fällen um positive Regulatoren des HOG-Signalwegs handelt (DEFOSSE et al., 2015). Auch in *A. fumigatus* erwies sich eine $\Delta tcsC$ Mutante als lebensfähig (MCCORMICK et al., 2012). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung des Kinase-Moduls von TcsC ausschlaggebend für die Aktivierung des HOG-Signalwegs ist. Exprimiert man das Kinase-Modul ohne das N-terminale Sensing-Modul, führt das zu einem Phänotyp, der dem von Fludioxonil behandelten wildtypischen Hyphen gleicht. Um nachzuweisen, dass dieser Effekt auf die Aktivität des Kinase-Moduls zurückzuführen ist, ersetzen wir den Histidinrest, der im aktiven Molekül

phosphoryliert wird, durch Alanin, und konnten so ein inaktives Kinase-Modul herstellen. Die resultierende Mutante wuchs wie unbehandelte wildtypische Hyphen. TcsC muss also phosphoryliert werden um den HOG-Signalweg zu aktivieren und ist damit eindeutig ein positiver Regulator, wie schematisch in Abbildung 11 dargestellt (SPADINGER & EBEL, 2017).

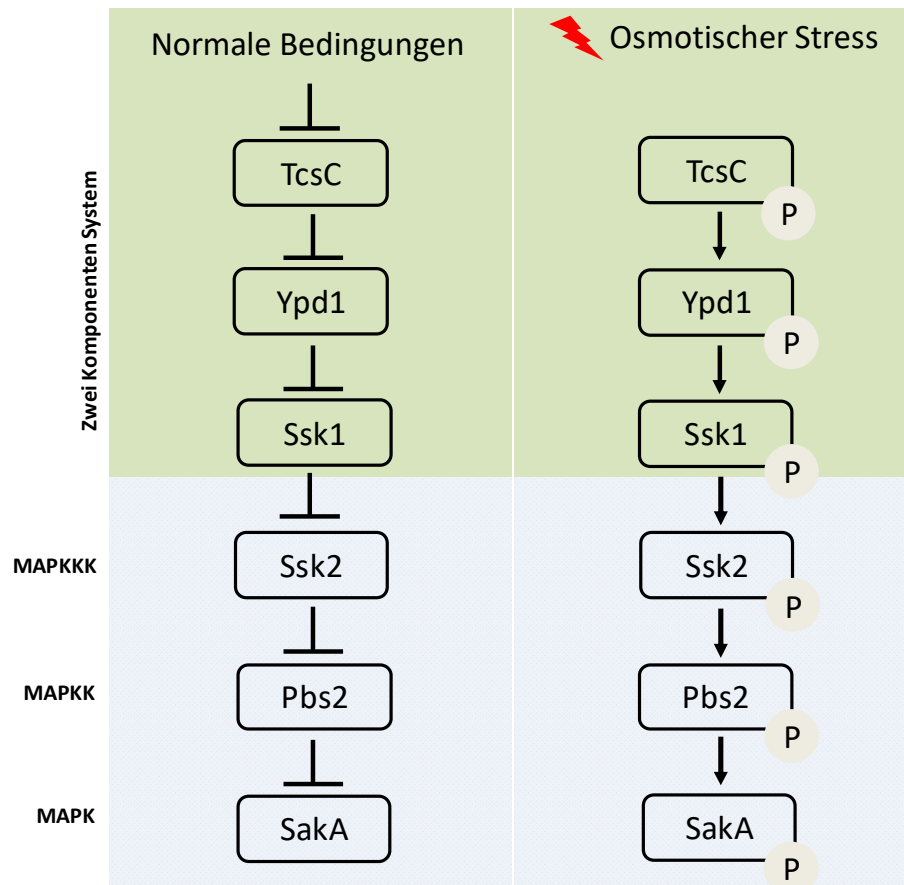


Abbildung 11: Modell der positiven Regulation des HOG-Signalwegs durch die Hybrid-Histidin-Kinase TcsC in *A. fumigatus*

Typ III Hybrid-Histidin-Kinasen in Hefen besitzen meist fünf HAMP-Domänen und sind negative Regulatoren des HOG-Signalwegs. In filamentösen Pilzen ist ein Cluster aus sechs HAMP-Domänen geläufiger und die Proteine regulieren den HOG-Signalweg meist positiv. Es scheint somit zwei Subklassen von Typ III Hybrid-Histidin-Kinasen zu geben, welche jeweils typisch für Hefen beziehungsweise typisch für filamentöse Pilze sind. Jedoch gibt es auch Ausnahmen. CaNik1 aus *Candida albicans* besitzt fünf HAMP-Domänen, ist aber nicht in der Lage, eine $\Delta sln1$ Mutante zu komplementieren und wurde als positiver Regulator des HOG-Signalwegs beschrieben (EL-MOWAFY et al., 2013), während die Typ III Hybrid-Histidin-Kinase Bos1 aus *Botrytis cinerea* sechs HAMP-Domänen besitzt, aber als negativer Regulator des HOG-Signalwegs

beschrieben wurde (LIU et al., 2008).

3. Die proximale HAMP-Domäne reguliert die Aktivität des Kinase-Moduls

Typ III Hybrid-Histidin-Kinasen besitzen einen typischen Aufbau. Der C-terminale Teil ist hoch konserviert und wird von der *Receiver*-Domäne gebildet. Den zentralen Teil bildet die Histidin-Kinase mit der HATPase_c Domäne (*histidine-kinase-like ATPase catalytic domain*). Der N-terminale Teil besteht aus einem Cluster von HAMP-Domänen, wobei die Anzahl der HAMP-Domänen zwischen fünf und elf variiert (DEFOSSE et al., 2015).

In Hinblick auf die Aktivität des Kinase-Moduls von TcsC in *A. fumigatus*, unabhängig vom Einfluss des Sensing-Moduls, gibt es zwei Möglichkeiten. Das Kinase-Modul könnte konstitutiv aktiv sein, was bedeuten würde, dass es unter normal-osmotischen Bedingungen durch das HAMP-Domänen-Cluster inhibiert wird, um den HOG-Signalweg inaktiv zu halten. Die zweite Möglichkeit ist, dass das Kinase-Modul per se inaktiv ist und erst bei der Wahrnehmung eines Stresssignals durch das Sensing-Modul aktiviert wird. Sollte das Kinase-Modul an sich konstitutiv aktiv sein, wäre die Expression eines solchen Proteins für die entsprechende Mutante letal, da eine konstitutiv aktive Kinase-Domäne zu einer permanenten Aktivierung des HOG-Signalwegs führen würde. In Anbetracht dessen, klonierten wir das Kinase-Modul unter Verwendung eines tet-on Promotors, der Doxycyclin-abhängig angeschaltet werden kann. So konnten wir zeigen, dass die induzierte Expression des Kinase-Moduls zu einem Phänotyp führt, der vergleichbar ist mit dem Fludioxonil-behandelter wildtypischer Hyphen. Die Expression des Kinase-Moduls löst somit eine permanente Aktivierung des HOG-Signalwegs aus und somit handelt es sich um eine konstitutiv aktive Kinase-Domäne (SPADINGER & EBEL, 2017). Die Aktivität des Kinase-Moduls muss unter Abwesenheit von osmotischem Stress durch das Sensing-Modul negativ kontrolliert werden, sie wird also vermutlich durch die Konformation des HAMP-Domänen-Clusters moduliert. Wir konnten zeigen, dass schon das Anfügen der proximalen HAMP₆-Domäne zu einem inaktiven Protein führt (SPADINGER & EBEL, 2017). Die proximale HAMP-Domäne alleine ist folglich in der Lage, die Aktivität des Kinase-Moduls zu inhibieren.

Meena *et al.* zeigten, dass die Expression des Kinase-Moduls von DhNik1 aus *D. hansenii* zu einem inaktiven Protein führt, sich somit deutlich anders verhält als das Kinase-Modul von TcsC. Das Anfügen der proximalen HAMP-Domäne, in diesem Fall HAMP₅, aktiviert das Kinase-Modul von DhNik1 (MEENA *et al.*, 2010). Dasselbe Muster ergab sich auch bei der Expression des Kinase-Moduls von CINik1 aus *C. lusitaniae*: Das entsprechende Protein ist inaktiv und das Anfügen der proximalen HAMP-Domäne führt zu einer Aktivierung (RANDHAWA *et al.*, 2016).

Für alle untersuchten Typ III Hybrid-Histidin-Kinasen konnte folglich festgestellt werden, dass die proximale HAMP-Domäne in der Lage ist, die Aktivität des Kinase-Moduls entweder positiv oder negativ zu regulieren. Das An- oder Abschalten des Kinase-Moduls kann nun in Zusammenhang mit der positiven oder negativen Regulation des gesamten HOG-Signalwegs betrachtet werden (Abbildung 12). TcsC aus *A. fumigatus* ist ein positiver Regulator des HOG-Signalwegs, um ihn zu aktivieren, muss TcsC phosphoryliert werden. Das Kinase-Modul von TcsC wird somit unter normal-osmotischen Bedingungen durch die proximale HAMP₆-Domäne inaktiviert. DhNik1 aus *D. hansenii* und CINik1 aus *C. lusitaniae* sind negative Regulatoren des HOG-Signalwegs, um ihn zu aktivieren, muss ihre Kinase-Aktivität gehemmt werden. Die Kinase-Module dieser Proteine sind per se inaktiv. Sie sind nicht in der Lage, Sln1 in *S. cerevisiae* zu ersetzen und führen nach Expression in *S. cerevisiae* zu einer Aktivierung des HOG-Signalwegs, da die hemmende Wirkung der vollständigen, aktiven Kinase auf das MAPK-Modul wegfällt (MEENA *et al.*, 2010, RANDHAWA *et al.*, 2016). Die proximale HAMP-Domäne reguliert hier das Kinase-Modul positiv, wodurch die Kinase aktiviert und der HOG-Signalweg inaktiviert wird, was wiederum dem Zustand unter normal-osmotischen Bedingungen entspricht. Ob die Regulation des Kinase-Moduls durch die proximale HAMP-Domäne positiv oder negativ ist, die Aktivität der Kinase an- oder abgeschaltet wird, hängt davon ab, ob die Hybrid-Histidin-Kinase im entsprechenden Organismus ein positiver oder negativer Regulator des HOG-Signalwegs ist. In allen Fällen wird das Kinase-Modul von der proximalen HAMP-Domäne alleine so reguliert, dass der HOG-Signalweg abgeschaltet wird.

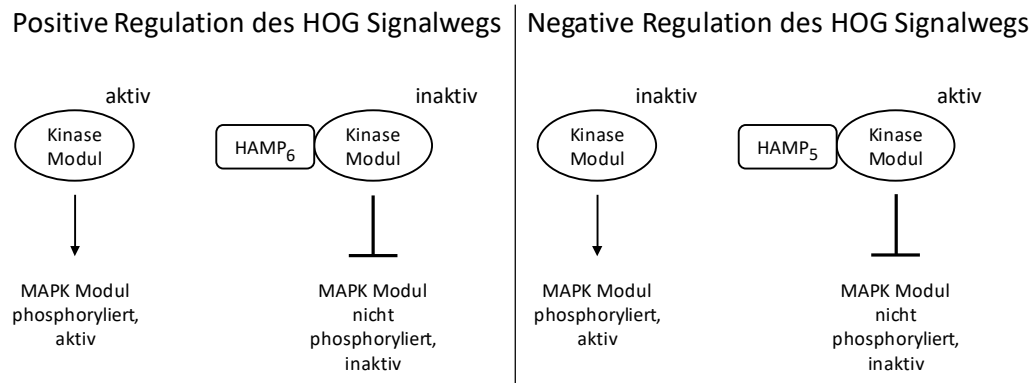


Abbildung 12: Zusammenhang zwischen der positiven oder negativen Regulation des Kinase-Moduls durch die proximale HAMP-Domäne und der positiven oder negativen Regulation des HOG-Signalwegs

Meena *et al.* untersuchten auch die Funktion der übrigen HAMP-Domänen von DhNik1. Wie oben erwähnt, muss das Kinase-Modul von DhNik1 durch die proximale HAMP₅-Domäne aktiviert werden, was zur Hemmung des HOG-Signalwegs führt. Die vorletzte HAMP-Domäne, HAMP₄, inaktiviert wiederum das Kinase-Modul. Aus diesen Ergebnissen und weiteren Versuchen, die Hinweise auf Dimerisierungen zwischen bestimmten HAMP-Domänen gaben, wurde folgendes Modell entwickelt (Abbildung 13): Unter normal-osmotischen Bedingungen kommt es zu Interaktionen zwischen der ersten, zweiten, dritten und vierten HAMP-Domäne welche dazu führen, dass zwischen HAMP₄ von HAMP₅ keine Interaktion stattfinden kann. HAMP₅ kann somit das Kinase-Modul aktivieren, was den HOG-Signalweg inaktiv hält. Soll der HOG-Signalweg unter osmotischem Stress aktiviert werden, werden die Interaktionen der HAMP-Domänen 1-4 dahingehend verändert, dass HAMP₄ freigegeben wird, nun mit HAMP₅ interagieren kann und somit die Aktivität der Kinase gehemmt wird (MEENA *et al.*, 2010).

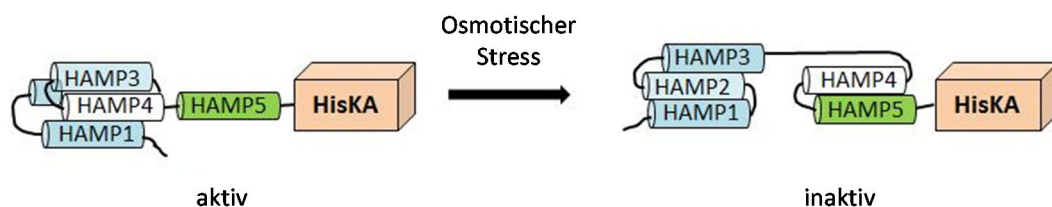


Abbildung 13: Regulation der Aktivität von DhNik1 in *Debaromyces hansenii* unter normal-osmotischen Bedingungen und unter osmotischem Stress

Modifiziert nach Meena *et al.* (MEENA *et al.*, 2010)

Wir haben ebenfalls die Funktion der übrigen HAMP-Domänen von TcsC in *A. fumigatus* untersucht. Das per se aktive Kinase-Modul kann durch die proximale HAMP₆-Domäne inhibiert werden. Die vorletzte HAMP-Domäne (HAMP₅) ist in der Lage, diese Inhibition teilweise wieder aufzuheben. Das sukzessive Anfügen weiterer HAMP-Domänen (HAMP₄ bis HAMP₁) führt zur Bildung von inaktiven Proteinen (SPADINGER & EBEL, 2017). Man kann somit auch hier beobachten, dass die HAMP-Domänen 1–4 in der Lage sind, die auch ohne osmotischen Stress auftretende, partielle Aktivierung des Kinase-Moduls durch HAMP₅ wieder aufzuheben. Dies führt dazu, dass das vollständige TcsC Protein in Abwesenheit von aktivierenden Signalen keine Kinaseaktivität zeigt. Weitere Versuche ergaben, dass für eine Reaktion auf hyperosmolaren Stress oder Fludioxonil alle sechs HAMP-Domänen nötig sind (SPADINGER & EBEL, 2017).

4. Interaktionen zwischen TcsC-Molekülen

In Typ III Hybrid-Histidin-Kinasen kann es nicht nur zur Dimerisierung von individuellen HAMP-Domänen des Moleküls kommen (MEENA et al., 2010), sondern auch Dimerbildungen zwischen kompletten Molekülen sind möglich, was anhand von Gelfiltration und anschließender Bestimmung des Molekulargewichts gezeigt werden konnte (KAUR et al., 2014).

Wir konnten zeigen, dass es in *A. fumigatus* zwischen verschiedenen TcsC Molekülen zu Interaktionen kommen muss, da sie sich gegenseitig in ihrer Aktivität beeinflussen können. Werden verkürzte Varianten von TcsC in einem *A. fumigatus* Wildtyp Stamm exprimiert, geht man zunächst davon aus, dass die Funktionalität des nativen TcsC davon unbeeinträchtigt bleibt. Überraschenderweise aber konnten wir feststellen, dass die Expression dieser verkürzten Proteine einen negativen Effekt auf die Empfindlichkeit des Stammes für Fludioxonil ausübt, das native TcsC somit inhibiert. Dieser Effekt ist am stärksten ausgeprägt bei der Expression des Kinase-Moduls mit der proximalen HAMP₆-Domäne. Dieses Protein zeigt keine intrinsische Aktivität (HAMP₆ inhibiert die Aktivität des Kinase-Moduls) und ist auch nicht durch Fludioxonil aktivierbar. Wird es aber in einem Stamm mit nativem TcsC exprimiert, inhibiert es dessen Funktionalität vollständig und führt zu einer Resistenz gegen Fludioxonil. Das Kinase-Modul mit der proximalen HAMP-Domäne übt somit einen dominant negativen Effekt auf das wildtypische TcsC aus. Werden nun sukzessive die übrigen HAMP-Domänen angefügt, lässt der negative Effekt auf das native TcsC mit steigender Anzahl von HAMP-Domänen

nach. Das Protein, welches alle sechs HAMP-Domänen besitzt, lässt dann wieder eine vollständige Sensitivität für Fludioxonil zu (SPADINGER & EBEL, 2017). Eine mögliche Erklärung für diese Ergebnisse wäre, dass die Expression der verkürzten TcsC-Varianten einerseits zur Bildung von Heterodimeren führt, gleichzeitig aber auch Interaktionen mit nativen TcsC Molekülen stattfinden und so deren Funktionalität beeinträchtigt wird. Die Beeinträchtigung des nativen TcsC ist desto deutlicher ausgeprägt, je stärker sich das verkürzte Protein vom ursprünglichen TcsC unterscheidet, wahrscheinlich reicht also schon die Anwesenheit von HAMP₆ für eine Dimerbildung aus. Mit der sukzessiven Addition der HAMP-Domänen und damit der Annäherung an das ursprüngliche Molekül wird die Funktionalität des nativen TcsC schrittweise zurückerlangt. Kommt es zur Dimerisierung zwischen einem nativen TcsC Molekül und einem Kinase-Modul mit allen sechs HAMP-Domänen, ist dieses Heterodimer vollständig funktionell, da beide beteiligten Proteine die Wirkung von Fludioxonil vermitteln. Ein solcher negativer Effekt bei der Expression einer verkürzten Variante einer Typ III Hybrid-Histidin-Kinase auf das entsprechende vollständige Protein wurde auch schon bei DhNik1 beobachtet. Wird DhNik1 in *S. cerevisiae* exprimiert, ist die resultierende Mutante sensibel für Fludioxonil. Werden DhNik1 und eine verkürzte Variante von DhNik1, welche nur das Kinase-Modul und die proximale HAMP-Domäne beinhaltet, gleichzeitig exprimiert, führt das zu einer vollständigen Resistenz gegenüber Fludioxonil (FURUKAWA et al., 2012).

5. Die Bedeutung der Lokalisation von TcsC

Bereits 1962 wurde entdeckt, dass Proteine an einem Histidin-Rest phosphoryliert werden können (BOYER et al., 1962). In Bakterien werden Stresssignale häufig über Zwei-Komponenten-Systeme verarbeitet, welche aus einer Sensor-Histidin-Kinase und einem Response-Regulator bestehen. Bakterielle Histidin-Kinasen sind Rezeptoren, die in der Zellmembran lokalisiert sind und so über ihre Sensor-Domäne Signale aus der Umgebung wahrnehmen können. Die zytoplasmatische Histidin-Kinase-Domäne überträgt dann den Phosphatrest auf einen Response-Regulator (BOURRET et al., 1991).

Auch die Typ VI Hybrid-Histidin-Kinase Sln1 aus *S. cerevisiae* besitzt in ihrem N-terminalen Bereich zwei Transmembrandomänen und ist somit in der Zellmembran lokalisiert (POSAS et al., 1996). Der Typ III Hybrid-Histidin-Kinase DhNik1 aus *Debaromyces hansenii* hingegen fehlt eine solche Transmembrandomäne und die

Fusion mit GFP zeigte, dass sich DhNik1 tatsächlich nicht in der Membran, sondern im Zytoplasma aufhält und somit ein zytoplasmatischer Osmosensor ist. Wie allerdings die Wahrnehmung von externen Stresssignalen durch einen im Zytoplasma lokalisierten Sensor bewerkstelligt wird, blieb unklar (MEENA et al., 2010). In der Aminosäuresequenz von TcsC in *A. fumigatus* kann eine potentielle Transmembrandomäne gefunden werden (GRICE et al., 2013). Diese müsste zwischen der HATPase_c und der *Receiver*-Domäne lokalisiert sein, somit würde sich die Histidin-Kinase von TcsC außerhalb der Zellmembran befinden. Da hier kein ATP bereitgestellt werden und somit keine Phosphorylierung stattfinden kann, ist diese Lokalisation für eine Transmembrandomäne eher unwahrscheinlich. Wird das TcsC-Kinase-Modul mit GFP fusioniert, zeigt sich eine zytoplasmatische Lokalisation, dies gilt auch für alle übrigen Konstrukte mit unterschiedlichen Anzahlen an HAMP-Domänen. Fusioniert man allerdings das komplette TcsC-Molekül mit GFP, ist dieses funktionelle Protein überraschenderweise nicht im Zytoplasma, sondern im Zellkern lokalisiert (eigene nicht publizierte Daten).

Untersucht man die Aminosäuresequenz von TcsC auf Bereiche, welche für eine Kernlokalisierung verantwortlich sein könnten, finden sich drei sogenannte *nuclear localization sequences* (NLS). Zwei davon befinden sich im Bereich der HATPase_c und der *Receiver*-Domäne und somit im C-terminalen Bereich des Proteins. Da dieser Bereich in den GFP-Fusionsproteinen, welche im Zytoplasma lokalisiert sind, enthalten ist, ist es eher unwahrscheinlich, dass diese beiden potentiellen NLS für die Kernlokalisierung des Gesamtproteins verantwortlich sind. Dies bestätigt auch die Expression eines GFP-Fusionsproteins der 300 C-terminalen Aminosäuren von TcsC, in welchen nur die HATPase_c und die *Receiver*-Domäne enthalten sind, da dieses Protein nicht in den Kern transportiert wird sondern im Zytoplasma bleibt (eigene nicht publizierte Daten). Die dritte NLS befindet sich innerhalb der ersten 200 Aminosäuren im N-terminalen Bereich von TcsC, noch vor der ersten HAMP-Domäne. Dies ist der einzige Bereich des Gesamtproteins, welcher in den Konstrukten mit unterschiedlicher Anzahl an HAMP-Domänen nicht exprimiert wurde, da auch im Protein mit allen sechs HAMP-Domänen der äußerste N-terminalen Bereich des Gesamtproteins fehlt. Somit unterscheidet sich das komplette GFP-TcsC-Fusionsprotein, welches im Kern lokalisiert ist, von dem GFP-TcsC-HAMP₁₋₆-Fusionsprotein, welches sich im Zytoplasma aufhält, nur durch die N-terminalen 200 Aminosäuren. Die Fusion dieser 200 Aminosäuren mit GFP legt nahe, dass dieser Bereich des Proteins eine zentrale Rolle für den

Transport in den Zellkern zu spielen scheint, da dieses Fusionsprotein im Zellkern lokalisiert ist (eigene nicht publizierte Daten).

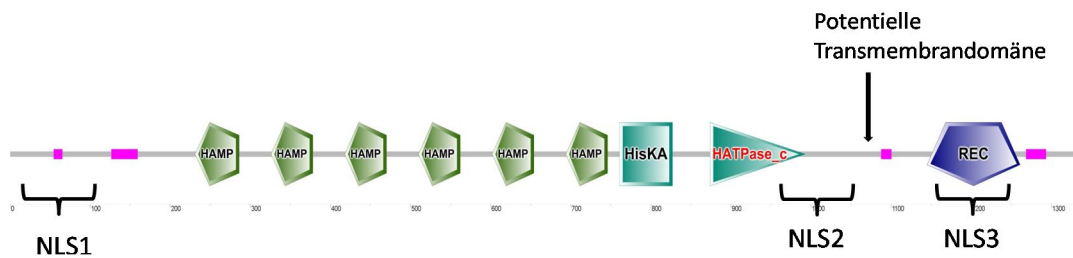


Abbildung 14: Nuclear localization sequences (NLS) und die potentielle Transmembrandomäne in TcsC aus *A. fumigatus*

HisKA: Histidin-Kinase-Domäne, HATPase_c: Histidine kinase-like ATPase catalytic domain, REC: Receiver-Domäne

Quelle: Vorhersage der Domänen mittels des SMART-Programms

Aktiviert man das GFP-TcsC-Fusionsprotein durch Fludioxonil oder durch hyperosmolaren Stress, behält es seine Lokalisation im Zellkern nicht bei, sondern ist nun im Zytoplasma zu finden. Es kommt somit bei der Aktivierung zu einer Translokation vom Kern in das Zytoplasma, welche auch wieder rückgängig gemacht werden kann, wenn der Stressor (Fludioxonil) entfernt wird (eigene nicht publizierte Daten). TcsC kann folglich vom Zellkern in das Zytoplasma und vom Zytoplasma in den Zellkern transportiert zu werden. Genau wie die aktive Form von TcsC befinden sich auch die aktive Kinase-Domäne und die übrigen verkürzten Konstrukte im Zytoplasma. Die Fusion des Hpt Proteins Ypd1 mit GFP zeigt, dass sich dieses Protein im Zytoplasma befindet und nach der Aktivierung des HOG-Signalwegs durch Fludioxonil in den Zellkern transportiert wird. TcsC befindet sich also unter normal-osmotischen Bedingungen im Zellkern und transloziert nach seiner Aktivierung in das Zytoplasma, wo die Phosphatgruppe auf Ypd1 übertragen wird (eigene nicht publizierte Daten).

War es schon schwer vorstellbar, wie ein im Zytoplasma lokalisierter Osmosensor externe Stresssignale wahrnehmen kann, scheint es nun umso schwerer, sich diese Funktion innerhalb des Zellkerns zu erklären. Werden Hyphen von *A. fumigatus* einer 1,2 M Sorbit-haltigen Umgebung ausgesetzt, führt das durch das starke osmotische Gefälle zu einem plötzlichen und starken Entzug von Wasser aus dem Zytoplasma. Dadurch kommt es zur Abnahme des Zytoplasmas und einer daraus resultierenden mechanischen Verformung des Zytoskeletts und der kompletten Zelle. Möglicherweise wird hierbei auch der Zellkern mechanisch verformt. Es

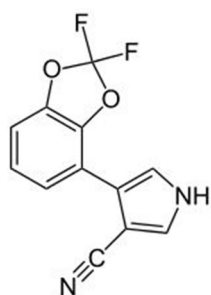
wurde bereits gezeigt, dass osmotischer Stress die Struktur des Zellkerns verändern kann und dass mechanischer Stress die Genexpression über biochemische Signalwege regulieren kann (FINAN & GUILAK, 2010). Denkbar wäre, dass eine mechanische Verformung des Kerns zu einer Aktivierung des im Zellkern befindlichen TcsC führt. Das TcsC-Molekül könnte hierbei über das N-terminale HAMP-Domänen-Cluster mit Rezeptoren der Kernmembran verbunden sein und somit mechanische Impulse wahrnehmen können. Auch möglich wäre, dass ein Sensorprotein existiert, welches TcsC übergeordnet ist, aber bis heute nicht identifiziert wurde.

6. Die Identifizierung neuer HOG-aktivierender Substanzen

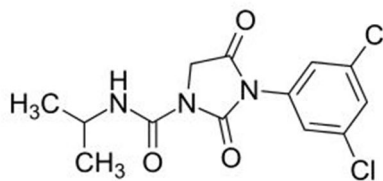
In dieser Arbeit wurde ausführlich dargelegt, dass ein Bedarf an neuen Therapiemöglichkeiten zur Behandlung invasiver Mykosen besteht und dringend gedeckt werden sollte. Es wurde gezeigt, dass die Aktivierung des pilzspezifischen HOG-Signalwegs eine gut geeignete Strategie zur Bekämpfung dieser Erkrankungen darstellt, da das Wachstum von Hyphen dadurch nicht nur blockiert wird, sondern auch massive Schäden bis hin zur Lyse des Pilzes auftreten.

Neben Fludioxonil sind weitere Fungizide wie Iprodion und Quintozene bekannt, welche den HOG-Signalweg aktivieren können. Diese Fungizide werden seit Jahrzehnten in der Landwirtschaft eingesetzt, um pflanzenpathogene Pilze zu bekämpfen (KILANI & FILLINGER, 2016).

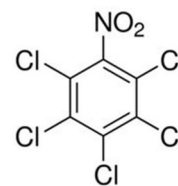
Eine mögliche therapeutische Wirkung von Fludioxonil wurde bereits in einem Eierinfektionsmodell der invasiven Aspergillose untersucht. Hierbei und in weiteren Versuchen konnte festgestellt werden, dass die Wirkung von Fludioxonil in proteinreichem Medium abnimmt, da es möglicherweise an Proteine wie Albumin bindet (persönliche Mitteilung von Prof. Dr. Frank Ebel). Daher ist Fludioxonil für den therapeutischen Einsatz weniger geeignet. Betrachtet man die chemische Struktur der Fungizide Fludioxonil, Iprodion und Quintozene, schematisch dargestellt in Abbildung 15, fällt auf, dass sich diese Substanzen in ihrem Aufbau stark unterscheiden.



Fludioxonil



Iprodion



Quintozene

Abbildung 15: Strukturformeln von Fludioxonil, Iprodion und Quintozene

Der HOG-Signalweg lässt sich durch eine Reihe von Substanzen mit stark unterschiedlichem chemischen Aufbau aktivieren. Dies lässt darauf schließen, dass auch andere, bisher unbekannte Substanzen in der Lage sind, diesen Signalweg zu adressieren, die möglicherweise besser für einen therapeutischen Einsatz im Menschen oder im Tier geeignet sind. Wir haben daher einen Screening Assay entwickelt, der es erlauben soll, weitere Substanzen mit HOG-aktivierenden Eigenschaften zu identifizieren (Abbildung 16). Ein *A. fumigatus* Wildtyp Stamm wird durch Fludioxonil in seinem Wachstum gehemmt. Eine *A. fumigatus* $\Delta tcsC$ Mutante ist dagegen resistent gegenüber Fludioxonil und kann ungehindert wachsen. Werden Konidien von GFP- beziehungsweise RFP (rot fluoreszierendem Protein)-exprimierender Varianten dieser beider Stämme zu gleichen Teilen gemischt und ohne den Einfluss einer fungiziden Substanz inkubiert, entsteht ein Geflecht aus Hyphen, welches gleichermaßen grünes und rotes Fluoreszenzsignal abgibt. Wird dieses Konidien-Gemisch mit einer fungiziden Substanz behandelt, welche den Pilz auf anderem Weg angreift als über den HOG-Signalweg, wird weder grünes noch rotes Fluoreszenzsignal messbar sein, da kein Wachstum stattfinden kann. Behandelt man das Gemisch aber mit einer HOG-aktivierenden Substanz, wird der GFP-exprimierende Wildtyp-Stamm im Wachstum gehemmt, während die RFP-exprimierende $\Delta tcsC$ Mutante normal weiter wächst. Dies führt dazu, dass ausschließlich rotes Fluoreszenzsignal wahrnehmbar ist, anhand dessen die HOG-aktivierende Eigenschaft der getesteten Substanz erkannt wird.

In Zukunft könnte das Prinzip dieses Screening Assays genutzt werden, um Substanzbibliotheken im Hochdurchsatzverfahren auf neue, HOG-aktivierende Fungizide zu untersuchen. Können solche identifiziert werden, sollte zunächst ihre Toxizität und ihre Wirkung auf andere pathogene Schimmelpilze untersucht werden. Anschließend sollte ihre Wirksamkeit in proteinreichem Medium gezeigt

werden, um sie in Infektionsmodellen einsetzen zu können.

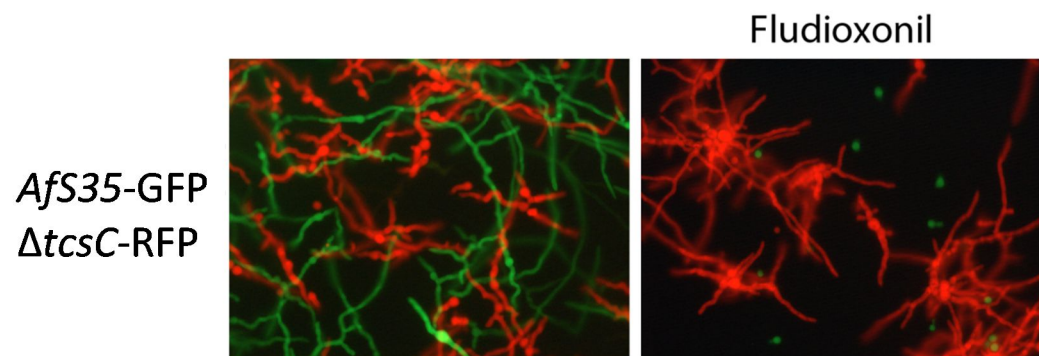


Abbildung 16: Screening Assay zur Identifizierung HOG-aktivierender Substanzen

V. ZUSAMMENFASSUNG

Neben bakteriellen und viralen Infektionskrankheiten nimmt die Bedeutung von Infektionen durch pathogene Pilze immer weiter zu. Die hohe Mortalitätsrate von invasiven Mykosen, die sich zwischen 40 % und 90 % bewegt, zeigt, dass diese Erkrankungen keinesfalls zu unterschätzen sind. Der Hauptauslöser invasiver Mykosen ist *Aspergillus*, wobei *A. fumigatus* die größte Rolle spielt. Jedoch sind auch Infektionen mit Nicht-*Aspergillus* Schimmelpilzen von zunehmender Bedeutung. Ein besonderes Risiko für die Entwicklung einer invasiven Mykose besteht, sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin, bei immunsupprimierten Patienten. Dazu gehören Patienten, die an AIDS oder CGD leiden, Patienten nach Organ- oder Stammzelltransplantation oder Patienten die sich einer Therapie mit Immunsuppressiva oder Chemotherapeutika unterziehen müssen. In der Veterinärmedizin spielen auch immunsupprimierende Haltungsbedingungen und Vorerkrankungen wie Tuberkulose eine Rolle. Die Therapie invasiver Mykosen schlägt oft fehl, da die Anzahl der zur Verfügung stehenden Antimykotika begrenzt ist und die Resistenzbildung gegen einige dieser Substanzen in den letzten Jahren stark zunimmt. Es besteht somit ein dringender Bedarf an der Entwicklung neuer therapeutischer Strategien. Einen alternativen Ansatz zu den bisher bekannten Behandlungsmöglichkeiten stellt die Aktivierung eines pilzspezifischen Signalwegs dar, der physiologischerweise unter anderem der Anpassung an hyperosmolaren Stress dient. Die pharmakologische Aktivierung des *High Osmolarity Glycerol* (HOG) Signalwegs führt zu einem Ungleichgewicht im Wasserhaushalt des Pilzes und kann großen Schaden anrichten, da es zu einem Einstrom von Wasser und damit zum Anschwellen bis hin zum Aufplatzen der Hyphen kommt. In dieser Arbeit wurde der Einfluss sogenannter HOG-aktivierender Substanzen wie Fludioxonil oder Iprodion auf *A. fumigatus* näher untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass durch die Aktivierung des HOG-Signalwegs zunächst ein fungistatischer Effekt erzielt werden kann, der sich durch eine andauernde Inkubation mit HOG-aktivierenden Substanzen zu einem fungiziden Effekt steigern lässt. Neben dem Anschwellen und Aufplatzen der Hyphen durch den Wassereinstrom lässt sich eine Umstrukturierung der pilzlichen Zellwand beobachten, wie die Freisetzung von Galaktomannan, einer vermehrten Einlagerung von Chitin und die verstärkte Bildung von Septen. Außerdem führt die Aktivierung des HOG-Signalwegs zu weiteren Störungen biologischer Funktionen

des Pilzes. So kommt es zur Aufhebung der Kontrollmechanismen der Mitose und des Schließens der Septenporen, was zu einer unkontrollierten Akkumulation von Zellkernen führt. Neben *Aspergillus* sind auch wichtige Vertreter von Nicht-*Aspergillus* Schimmelpilzen empfindlich für HOG-aktivierende Substanzen. Infektionen mit diesen Pilzen sind von zunehmender Bedeutung, da sie schwere Krankheitsverläufe auslösen, die oft noch schwerer zu therapieren sind als Infektionen mit *Aspergillus*. Nach heutigem Wissen wird die Aktivierung des HOG-Signalwegs durch Typ III Hybrid-Histidin-Kinasen vermittelt. Somit bieten diese pilzspezifischen Proteine attraktive Angriffspunkte für die Entwicklung neuer Antimykotika. In dieser Arbeit wurde die Typ III Hybrid-Histidin-Kinase (HHK) TcsC aus *A. fumigatus* auf molekularer Ebene charakterisiert. Die sich hieraus ergebenden Daten legen nahe, dass es zwei Subklassen von Typ III HHK zu geben scheint, die jeweils typisch für Hefen und typisch für filamentöse Pilze sind. Typ III HHK in Hefen regulieren den HOG-Signalweg in der Regel negativ, sie werden unter osmotischem Stress inaktiviert. In filamentösen Pilzen, wie *A. fumigatus*, ist das Gegenteil der Fall. Die Typ III HHK reguliert den Signalweg positiv, sie wird erst unter osmotischem Stress aktiv. Dies korreliert auch mit der Aktivität beziehungsweise Inaktivität der isolierten Kinase-Module der jeweiligen Proteine. Handelt es sich um einen negativen Regulator des HOG-Signalwegs, wird das entsprechende Kinase-Modul von der proximalen HAMP-Domäne angeschaltet. Wird der HOG-Signalweg durch die Typ III HHK positiv reguliert, fungiert die proximale HAMP-Domäne als Ausschalter des Kinase-Moduls. In jedem Fall wird somit das Kinase-Modul durch die proximale HAMP-Domäne so reguliert, dass der HOG-Signalweg abgeschaltet wird. Zudem konnten wir zeigen, dass verkürzte TcsC-Varianten einen dominant negativen Effekt auf das native TcsC Protein ausüben. Es ist folglich wahrscheinlich, dass diese Moleküle miteinander interagieren und Dimere bilden können. Es wird davon ausgegangen, dass Typ III HHK zytoplasmatische Osmosensoren sind. Wir konnten jedoch zeigen, dass sich TcsC im Zellkern befindet und erst bei Aktivierung in das Zytoplasma transloziert. Darüber, wie in dieser Lokalisation externe Stresssignale wahrgenommen werden können, kann bisher nur spekuliert werden. Zukünftig sollen weitere HOG-aktivierende Substanzen anhand eines in dieser Arbeit neu etablierten Screening Assays identifiziert und auf ihre Eignung für einen therapeutischen Einsatz hin untersucht werden.

VI. SUMMARY

In addition to bacterial and viral infectious diseases, the importance of infections caused by pathogenic fungi is increasing. The high mortality rate of invasive mycoses, which ranges from 40% to 90%, shows that these diseases should not be underestimated. The main trigger of invasive mycoses is *Aspergillus*, with *A. fumigatus* playing the most important role. However, infections with non-*Aspergillus* molds are also of increasing importance. There is a particular risk for the development of invasive mycosis, both in human and veterinary medicine, in immunosuppressed patients. These include patients suffering from AIDS or CGD, patients after organ transplantation or stem cell transplantation, or patients undergoing immunosuppressive therapy or chemotherapy. In veterinary medicine, immunosuppressive conditions and pre-existing diseases such as tuberculosis also play a role. The therapy of invasive mycosis often fails due to the limited number of available antimycotics and the incidence of resistance to some of these substances strongly increased in recent years. Therefore, there is an urgent need for the development of new therapeutic strategies. An alternative approach to the hitherto existing treatment options is the activation of the *High Osmolarity Glycerol* (HOG) pathway, a fungal specific signaling cascade, which physiologically serves, among other things, the adaption to hyperosmotic conditions. The pharmacological activation of the HOG pathway leads to an imbalance of the hydrological balance of the fungus and can cause massive damage, due to an influx of water and subsequent swelling up to bursting of hyphae. In this study, the influence of HOG-activating substances, like Fludioxonil or Iprodione, was examined in more detail. It could be shown that the activation of the HOG pathway results in a fungistatic effect which can be reinforced by a continuous incubation with HOG activating substances to a fungicidal effect. In addition to the swelling and bursting of hyphae by the influx of water, a reorganization of the fungal cell wall can be observed, such as a release of galactomannan, an increased incorporation of chitin and an enhanced formation of septa. Moreover, the activation of the HOG pathway leads to further disturbances of the biological functions of the fungus, the control mechanisms of mitosis and closure of septal pores are abrogated, leading to an uncontrolled accumulation of nuclei. Besides *Aspergillus*, important representatives of non-*Aspergillus* fungi are sensitive for HOG activating substances. Infections with these

fungi are of increasing importance since they trigger severe pathologies that are often even more difficult to treat than infections with *Aspergillus*. According to current knowledge, activation of the HOG pathway is mediated by type III hybrid histidine kinases. Thus, these fungi-specific proteins represent attractive target structures for the development of new antifungal agents. In this study, the type III HHK TcsC from *A. fumigatus* was characterized at the molecular level. The resulting data suggest the existence of two subclasses of type III HHK, typical for yeasts or filamentous fungi. Type III HHKs in yeasts normally regulate the HOG pathway negatively, so they are inactivated under osmotic stress. In filamentous fungi, such as *A. fumigatus*, the opposite is the case, the type III HHK regulates the signaling pathway positively and becomes active only under osmotic stress. This also correlates with the activity or inactivity of the isolated kinase modules of the respective proteins. In the case of a negative regulator of the HOG pathway, the corresponding kinase module is switched on by the proximal HAMP domain. If the HOG pathway is positively regulated by the type III hybrid histidine kinase, the proximal HAMP domain inactivates the kinase module. In any case, the kinase module is regulated by the proximal HAMP domain in such a way that the HOG pathway is switched off. We also showed that truncated variants of TcsC exert a dominantly negative effect on the native TcsC protein. It is therefore probable that these molecules interact with one another and form dimers. It is assumed that type III hybrid histidine kinases are cytoplasmic osmosensors, but we were able to show that TcsC is located into the cell nucleus and translocates into the cytoplasm only upon activation. How external stress signals can be perceived in this location, can only be speculated so far. In the future, further HOG-activating substances are to be identified using a screening assay newly established in this work and tested for their suitability for therapeutic use.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

Abad A, Fernandez-Molina JV, Bikandi J, Ramirez A, Margareto J, Sendino J, Hernando FL, Ponton J, Garaizar J, Rementeria A. What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. *Rev Iberoam Micol* 2010; 27: 155-82.

Abdo W, Kawachi T, Sakai H, Fukushi H, Kano R, Shibahara T, Shirouzu H, Kakizoe Y, Tuji H, Yanai T. Disseminated mycosis in a killer whale (*Orcinus orca*). *J Vet Diagn Invest* 2012; 24: 211-8.

Adamama-Moraitou KK, Pardali D, Day MJ, Denning DW, Papazoglou L, Papastefanou A, Rallis TS. *Aspergillus fumigatus* Bronchopneumonia in a Hellenic Shepherd Dog. *J Am Anim Hosp Assoc* 2011; 47: e13-8.

Addrizzo-Harris DJ, Harkin TJ, McGuinness G, Naidich DP, Rom WN. Pulmonary aspergilloma and AIDS. A comparison of HIV-infected and HIV-negative individuals. *Chest* 1997; 111: 612-8.

Aimanianda V, Bayry J, Bozza S, Knemeyer O, Perruccio K, Elluru SR, Clavaud C, Paris S, Brakhage AA, Kaveri SV, Romani L, Latge J-P. Surface hydrophobin prevents immune recognition of airborne fungal spores. *Nature* 2009; 460: 1117-21.

Alastruey-Izquierdo A, Cuesta I, Walther G, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. Antifungal susceptibility profile of human-pathogenic species of *Lichtheimia*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 3058-60.

Amitani R, Taylor G, Elezis EN, Llewellyn-Jones C, Mitchell J, Kuze F, Cole PJ, Wilson R. Purification and characterization of factors produced by *Aspergillus fumigatus* which affect human ciliated respiratory epithelium. *Infect Immun* 1995; 63: 3266-71.

Azevedo M-M, Faria-Ramos I, Cruz LC, Pina-Vaz C, Gonçalves Rodrigues A. Genesis of Azole Antifungal Resistance from Agriculture to Clinical Settings. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2015; 63: 7463-8.

Bahn YS. Master and commander in fungal pathogens: the two-component system and the HOG signaling pathway. *Eukaryot Cell* 2008; 7: 2017-36.

Barachetti L, Mortellaro CM, Di Giancamillo M, Giudice C, Martino P, Travetti O, Miller PE. Bilateral orbital and nasal aspergillosis in a cat. *Vet Ophthalmol* 2009; 12: 176-82.

Barnes PD, Marr KA. Risks, diagnosis and outcomes of invasive fungal infections in haematopoietic stem cell transplant recipients. *Br J Haematol* 2007; 139: 519-31.

Barrs VR, Halliday C, Martin P, Wilson B, Krockenberger M, Gunew M, Bennett S, Koehlmeier E, Thompson A, Fliegner R, Hocking A, Sleiman S, O'Brien C, Beatty JA. Sinonasal and sino-orbital aspergillosis in 23 cats: aetiology, clinicopathological features and treatment outcomes. *Vet J* 2012; 191: 58-64.

Barrs VR, Talbot JJ. Feline aspergillosis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2014; 44: 51-73.

Bates DW, Su L, Yu DT, Chertow GM, Seger DL, Gomes DRJ, Dasbach EJ, Platt R. Mortality and Costs of Acute Renal Failure Associated with Amphotericin B Therapy. *Clinical Infectious Diseases* 2001; 32: 686-93.

Beck J (2014) Woronin Körper von *Aspergillus fumigatus*, ihre Verankerung am Hyphenseptum und Bedeutung für die Stressresistenz und Virulenz dieses pathogenen Schimmelpilzes

Ludwig-Maximilians-Universität München, München

Beckman BJ, Howe CW, Trampel DW, DeBey MC, Richard JL, Niyo Y. *Aspergillus fumigatus* keratitis with intraocular invasion in 15-day-old chicks.

Avian Dis 1994; 38: 660-5.

Beernaert LA, Pasmans F, Van Waeyenberghe L, Dorrestein GM, Verstappen F, Vercammen F, Haesebrouck F, Martel A. Avian *Aspergillus fumigatus* strains resistant to both itraconazole and voriconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 2199-201.

Beernaert LA, Pasmans F, Van Waeyenberghe L, Haesebrouck F, Martel A. *Aspergillus* infections in birds: a review. *Avian Pathology* 2010; 39: 325-31.

Bennett JE. Echinocandins for candidemia in adults without neutropenia. *N Engl J Med* 2006; 355: 1154-9.

Berenguer J, Allende MC, Lee JW, Garrett K, Lyman C, Ali NM, Bacher J, Pizzo PA, Walsh TJ. Pathogenesis of pulmonary aspergillosis. Granulocytopenia versus cyclosporine and methylprednisolone-induced immunosuppression. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 1079-86.

Billen F, Clercx C, Le Garerres A, Massart L, Mignon B, Peeters D. Effect of sampling method and incubation temperature on fungal culture in canine sinonasal aspergillosis. *J Small Anim Pract* 2009; 50: 67-72.

Bloemendal S, Kück U. Cell-to-cell communication in plants, animals, and fungi: a comparative review. *Naturwissenschaften* 2013; 100: 3-19.

Bourret RB, Borkovich KA, Simon MI. Signal transduction pathways involving protein phosphorylation in prokaryotes. *Annu Rev Biochem* 1991; 60: 401-41.

Boyer PD, Deluca M, Ebner KE, Hultquist DE, Peter JB. Identification of phosphohistidine in digests from a probable intermediate of oxidative phosphorylation. *J Biol Chem* 1962; 237: Pc3306-pc8.

Brown GD, Denning DW, Gow NA, Levitz SM, Netea MG, White TC. Hidden

killers: human fungal infections. *Sci Transl Med* 2012; 4: 165rv13.

Brown RE, Brain JD, Wang N. The avian respiratory system: a unique model for studies of respiratory toxicosis and for monitoring air quality. *Environ Health Perspect* 1997; 105: 188-200.

Bruder Nascimento AC, Dos Reis TF, de Castro PA, Hori JI, Bom VL, de Assis LJ, Ramalho LN, Rocha MC, Malavazi I, Brown NA, Valiante V, Brakhage AA, Hagiwara D, Goldman GH. Mitogen activated protein kinases SakA(HOG1) and MpkC collaborate for *Aspergillus fumigatus* virulence. *Mol Microbiol* 2016; 100: 841-59.

Carlile MJ, Watkinson SC, Gooday GW (2001) *The fungi*, 2 edn. Acad. Press, San Diego

Carrasco L, Mendez A, Jensen HE. Chronic bronchopulmonary aspergillosis in a horse with Cushing's syndrome. *Mycoses* 1996; 39: 443-7.

Catlett NL, Yoder OC, Turgeon BG. Whole-genome analysis of two-component signal transduction genes in fungal pathogens. *Eukaryot Cell* 2003; 2: 1151-61.

Chotirmall SH, Al-Alawi M, Mirkovic B, Lavelle G, Logan PM, Greene CM, McElvaney NG. *Aspergillus*-Associated Airway Disease, Inflammation, and the Innate Immune Response. *BioMed Research International* 2013; 2013: 723129.

Cole RJ, Kirksey JW, Dorner JW, Wilson DM, Johnson JC, Jr., Johnson AN, Bedell DM, Springer JP, Chexal KK, Clardy JC, Cox RH. Mycotoxins produced by *Aspergillus fumigatus* species isolated from molded silage. *J Agric Food Chem* 1977; 25: 826-30.

Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, Stewart AJ, Kurz EU, Duncan AM, Deeley RG. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 1992; 258: 1650-4.

Cook WR. Observations on the aetiology of epistaxis and cranial nerve paralysis in the horse. *Vet Rec* 1966; 78: 396-406.

Cortez KJ, Roilides E, Quiroz-Telles F, Meletiadiis J, Antachopoulos C, Knudsen T, Buchanan W, Milanovich J, Sutton DA, Fothergill A, Rinaldi MG, Shea YR, Zaoutis T, Kottitil S, Walsh TJ. Infections Caused by *Scedosporium* spp. *Clin Microbiol Rev* 2008; 21: 157-97.

Dagenais TRT, Keller NP. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22: 447-65.

Dagleish MP, Foster G, Howie FE, Reid RJ, Barley J. Fatal mycotic encephalitis caused by *Aspergillus fumigatus* in a northern bottlenose whale (*Hyperoodon ampullatus*). *Vet Rec* 2008; 163: 602-4.

De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, Pappas PG, Maertens J, Lortholary O, Kauffman CA, Denning DW, Patterson TF, Maschmeyer G, Bille J, Dismukes WE, Herbrecht R, Hope WW, Kibbler CC, Kullberg BJ, Marr KA, Munoz P, Odds FC, Perfect JR, Restrepo A, Ruhnke M, Segal BH, Sobel JD, Sorrell TC, Viscoli C, Wingard JR, Zaoutis T, Bennett JE. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis* 2008; 46: 1813-21.

Defosse TA, Sharma A, Mondal AK, Duge de Bernonville T, Latge JP, Calderone R, Giglioli-Guivarc'h N, Courdavault V, Clastre M, Papon N. Hybrid histidine kinases in pathogenic fungi. *Mol Microbiol* 2015; 95: 914-24.

Denning DW. Invasive Aspergillosis. *Clinical Infectious Diseases* 1998; 26: 781-803.

Dignani MC, Anaissie E. Human fusariosis. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10 Suppl 1: 67-75.

Dobesova O, Schwarz B, Velde K, Jahn P, Zert Z, Bezdekova B. Guttural pouch mycosis in horses: a retrospective study of 28 cases. *Vet Rec* 2012; 171: 561.

Douglas AP, Chen SC, Slavin MA. Emerging infections caused by non-*Aspergillus* filamentous fungi. *Clin Microbiol Infect* 2016; 22: 670-80.

El-Mowafy M, Bahgat MM, Bilitewski U. Deletion of the HAMP domains from the histidine kinase CaNik1p of *Candida albicans* or treatment with fungicides activates the MAP kinase Hog1p in *S. cerevisiae* transformants. *BMC Microbiol* 2013; 13: 209.

Enoch DA, Ludlam HA, Brown NM. Invasive fungal infections: a review of epidemiology and management options. *Journal of Medical Microbiology* 2006; 55: 809-18.

Fassler JS, West AH. Histidine Phosphotransfer Proteins in Fungal Two-Component Signal Transduction Pathways. *Eukaryot Cell* 2013; 12: 1052-60.

Finan JD, Guilak F. The effects of osmotic stress on the structure and function of the cell nucleus. *J Cell Biochem* 2010; 109: 460-7.

Floss HG, Manni PE, Hamill RL, Mabe JA. Further studies on the biosynthesis of pyrrolnitrin from tryptophan by *Pseudomonas*. *Biochem Biophys Res Commun* 1971; 45: 781-7.

Furukawa K, Randhawa A, Kaur H, Mondal AK, Hohmann S. Fungal fludioxonil sensitivity is diminished by a constitutively active form of the group III histidine kinase. *FEBS Lett* 2012; 586: 2417-22.

G.S. de Hoog JG, J. Gene, M.J. Figueras (2000) *Atlas of Clinical Fungi*, Reus

Georgiadou SP, Sipsas NV, Marom EM, Kontoyiannis DP. The diagnostic value of halo and reversed halo signs for invasive mold infections in compromised hosts.

Clin Infect Dis 2011; 52: 1144-55.

Grice CM, Bertuzzi M, Bignell EM. Receptor-mediated signaling in *Aspergillus fumigatus*. Front Microbiol 2013; 4: 26.

Groß U (2013) Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, 3 edn. Thieme, Stuttgart

Große V, Krappmann S. The Asexual Pathogen *Aspergillus fumigatus* Expresses Functional Determinants of *Aspergillus nidulans* Sexual Development. Eukaryot Cell 2008; 7: 1724-32.

Guillot J, Collobert C, Gueho E, Mialot M, Lagarde E. *Emericella nidulans* as an agent of guttural pouch mycosis in a horse. J Med Vet Mycol 1997; 35: 433-5.

Hajjaj H, Niederberger P, Duboc P. Lovastatin Biosynthesis by *Aspergillus terreus* in a Chemically Defined Medium. Appl Environ Microbiol 2001; 67: 2596-602.

Hamet N, Seigle-Murandi F, Steiman R. Contribution to the prophylaxis of chicks aspergillosis: study of the contamination of a hatchery by *Aspergillus fumigatus*. Zentralbl Veterinarmed B 1991; 38: 529-37.

Hattel AL, Drake TR, Anderholm BJ, McAllister ES. Pulmonary aspergillosis associated with acute enteritis in a horse. J Am Vet Med Assoc 1991; 199: 589-90.

Hof H. Critical annotations to the use of azole antifungals for plant protection. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 2987-90.

Hohmann S. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. Microbiol Mol Biol Rev 2002; 66: 300-72.

Hohmann S. Control of high osmolarity signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett 2009; 583: 4025-9.

Jensen HE, Olsen SN, Aalbaek B. Gastrointestinal aspergillosis and zygomycosis of cattle. *Vet Pathol* 1994; 31: 28-36.

Kaur H, Singh S, Rathore YS, Sharma A, Furukawa K, Hohmann S, Ashish, Mondal AK. Differential role of HAMP-like linkers in regulating the functionality of the group III histidine kinase DhNik1p. *J Biol Chem* 2014; 289: 20245-58.

Kendall A, Brojer J, Karlstam E, Pringle J. Enilconazole treatment of horses with superficial *Aspergillus* spp. rhinitis. *J Vet Intern Med* 2008; 22: 1239-42.

Kilani J, Fillinger S. Phenylpyrroles: 30 Years, Two Molecules and (Nearly) No Resistance. *Front Microbiol* 2016; 7: 2014.

Klich MA. Identification of clinically relevant aspergilli. *Medical Mycology* 2006; 44: 127-31.

Knudtson WU, Kirkbride CA. Fungi associated with bovine abortion in the northern plains states (USA). *J Vet Diagn Invest* 1992; 4: 181-5.

Kojima K, Takano Y, Yoshimi A, Tanaka C, Kikuchi T, Okuno T. Fungicide activity through activation of a fungal signalling pathway. *Mol Microbiol* 2004; 53: 1785-96.

L. Hawksworth D. The magnitude of fungal diversity: the 1·5 million species estimate revisited. *Mycological Research* 2002; 105: 1422-32.

Langfelder K, Streibel M, Jahn B, Haase G, Brakhage AA. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Genetics and Biology* 2003; 38: 143-58.

Las Heras A, Dominguez L, Lopez I, Paya MJ, Pena L, Mazzucchelli F, Garcia LA, Fernandez-Garayzabal JF. Intramammary *Aspergillus fumigatus* infection in dairy ewes associated with antibiotic dry therapy. *Vet Rec* 2000; 147: 578-80.

Latgé JP. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. Clin Microbiol Rev 1999; 12: 310-50.

Lavin JL, Ramirez L, Ussery DW, Pisabarro AG, Oguiza JA. Genomic analysis of two-component signal transduction proteins in basidiomycetes. J Mol Microbiol Biotechnol 2010; 18: 63-73.

Laxminarayan R, Mills AJ, Breman JG, Measham AR, Alleyne G, Claeson M, Jha P, Musgrove P, Chow J, Shahid-Salles S, Jamison DT. Advancement of global health: key messages from the Disease Control Priorities Project. Lancet 2006; 367: 1193-208.

Lee SH, Barnes WG, Schaetzel WP. Pulmonary aspergillosis and the importance of oxalate crystal recognition in cytology specimens. Arch Pathol Lab Med 1986; 110: 1176-9.

Leiding JW, Holland SM. Chronic Granulomatous Disease. In: GeneReviews(R). Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LJH, Bird TD, Ledbetter N, Mefford HC, Smith RJH, Stephens K, eds. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993

Lepage OM, Piccot-Crezollet C. Transarterial coil embolisation in 31 horses (1999-2002) with guttural pouch mycosis: a 2-year follow-up. Equine Vet J 2005; 37: 430-4.

Lin SJ, Schranz J, Teutsch SM. Aspergillosis case-fatality rate: systematic review of the literature. Clin Infect Dis 2001; 32: 358-66.

Liu W, Leroux P, Fillinger S. The HOG1-like MAP kinase Sak1 of *Botrytis cinerea* is negatively regulated by the upstream histidine kinase Bos1 and is not involved in dicarboximide- and phenylpyrrole-resistance. Fungal Genet Biol 2008; 45: 1062-74.

Maeda T, Wurgler-Murphy SM, Saito H. A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature* 1994; 369: 242-5.

Maina JN. Development, structure, and function of a novel respiratory organ, the lung-air sac system of birds: to go where no other vertebrate has gone. *Biol Rev Camb Philos Soc* 2006; 81: 545-79.

Marr KA, Balajee SA, McLaughlin L, Tabouret M, Bentsen C, Walsh TJ. Detection of galactomannan antigenemia by enzyme immunoassay for the diagnosis of invasive aspergillosis: variables that affect performance. *J Infect Dis* 2004a; 190: 641-9.

Marr KA, Boeckh M, Carter RA, Kim HW, Corey L. Combination antifungal therapy for invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* 2004b; 39: 797-802.

Mascher T, Helmann JD, Uuden G. Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* 2006; 70: 910-38.

Maturu VN, Agarwal R. Prevalence of *Aspergillus* sensitization and allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis: systematic review and meta-analysis. *Clin Exp Allergy* 2015; 45: 1765-78.

McCormick A, Loeffler J, Ebel F. *Aspergillus fumigatus*: contours of an opportunistic human pathogen. *Cellular Microbiology* 2010; 12: 1535-43.

McCormick A, Jacobsen ID, Broniszewska M, Beck J, Heesemann J, Ebel F. The Two-Component Sensor Kinase TcsC and Its Role in Stress Resistance of the Human-Pathogenic Mold *Aspergillus fumigatus*. *PLoS ONE* 2012; 7: e38262.

Meena N, Kaur H, Mondal AK. Interactions among HAMP domain repeats act as an osmosensing molecular switch in group III hybrid histidine kinases from fungi. *J Biol Chem* 2010; 285: 12121-32.

Meis JF, Chowdhary A, Rhodes JL, Fisher MC, Verweij PE. Clinical implications of globally emerging azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2016; 371

Mohammed MA, Sokkar SM, Batrawi A, Refaie MK, Ahmed AA. Natural and experimental nodular dermatomycosis in chickens. *Avian Pathol* 1980; 9: 185-92.

Morgavi DP, Boudra H, Jouany JP, Michalet-Doreau B. Effect and stability of gliotoxin, an *Aspergillus fumigatus* toxin, on in vitro rumen fermentation. *Food Addit Contam* 2004; 21: 871-8.

Muntz FH. Oxalate-producing pulmonary aspergillosis in an alpaca. *Vet Pathol* 1999; 36: 631-2.

Nardoni S, Ceccherelli R, Rossi G, Mancianti F. Aspergillosis in *Larus cachinnans* *micaellis*: survey of eight cases. *Mycopathologia* 2006; 161: 317-21.

Ni M, Yu JH. A Novel Regulator Couples Sporogenesis and Trehalose Biogenesis in *Aspergillus nidulans*. *PLoS ONE* 2007; 2

Nucci M, Marr KA. Emerging Fungal Diseases. *Clinical Infectious Diseases* 2005; 41: 521-6.

Nucci M, Carlesse F, Cappellano P, Varon AG, Seber A, Garnica M, Nouer SA, Colombo AL. Earlier diagnosis of invasive fusariosis with *Aspergillus* serum galactomannan testing. *PLoS ONE* 2014; 9: e87784.

O'Gorman CM, Fuller HT, Dyer PS. Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature* 2009; 457: 471-4.

Okada A, Banno S, Ichiishi A, Kimura M, Yamaguchi I, Fujimura M. Pyrrolnitrin Interferes with Osmotic Signal Transduction in *Neurospora crassa*. *Journal of Pesticide Science* 2005; 30: 378-83.

Ostrosky-Zeichner L. Invasive mycoses: diagnostic challenges. *Am J Med* 2012; 125: S14-24.

Ota IM, Varshavsky A. A yeast protein similar to bacterial two-component regulators. *Science* 1993; 262: 566-9.

Peeters D, Clercx C. Update on canine sinonasal aspergillosis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2007; 37: 901-16, vi.

Perez V, Corpa JM, Garcia Marin JF, Aduriz JJ, Jensen HE. Mammary and systemic aspergillosis in dairy sheep. *Vet Pathol* 1998; 35: 235-40.

Pfeiffer CD, Fine JP, Safdar N. Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2006; 42: 1417-27.

Posas F, Wurgler-Murphy SM, Maeda T, Witten EA, Thai TC, Saito H. Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 "two-component" osmosensor. *Cell* 1996; 86: 865-75.

Randhawa A, Chawla S, Mondal AK. Functional dissection of HAMP domains in NIK1 ortholog from pathogenic yeast *Candida lusitanae*. *Gene* 2016; 577: 251-7.

Rankin NE. Disseminated aspergillosis and moniliasis associated with agranulocytosis and antibiotic therapy. *Br Med J* 1953; 1: 918-9.

Raper KB (1965) The genus *Aspergillus*. Williams u. Wilkins, Baltimore

Richard JL, Thurston JR. Rapid hematogenous dissemination of *Aspergillus fumigatus* and *A. flavus* spores in turkey poult following aerosol exposure. *Avian Dis* 1983; 27: 1025-33.

Richard JL, Dvorak TJ, Ross PF. Natural occurrence of gliotoxin in turkeys infected with *Aspergillus fumigatus*, Fresenius. *Mycopathologia* 1996; 134: 167-70.

Rohde M, Schwienbacher M, Nikolaus T, Heesemann J, Ebel F. Detection of early phase specific surface appendages during germination of *Aspergillus fumigatus* conidia. FEMS Microbiol Lett 2002; 206: 99-105.

Rosenberg M, Patterson R, Mintzer R, Cooper BJ, Roberts M, Harris KE. Clinical and immunologic criteria for the diagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis. Ann Intern Med 1977; 86: 405-14.

Ruchel R, Reichard U. Pathogenesis and clinical presentation of aspergillosis. Contrib Microbiol 1999; 2: 21-43.

Saier MH, Jr. A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. Microbiol Mol Biol Rev 2000; 64: 354-411.

Sansom J, Featherstone H, Barnett KC. Keratomycosis in six horses in the United Kingdom. Vet Rec 2005; 156: 13-7.

Sarfati J, Jensen HE, Latge JP. Route of infections in bovine aspergillosis. J Med Vet Mycol 1996; 34: 379-83.

Schlam D, Canton J, Carreno M, Kopinski H, Freeman SA, Grinstein S, Fairn GD. Gliotoxin Suppresses Macrophage Immune Function by Subverting Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate Homeostasis. MBio 2016; 7: e02242.

Schmidt A. Georg Fresenius und die Spezies *Aspergillus fumigatus*. Mycoses 1998; 41: 89-91.

Schoonbeek H-j, van Nistelrooy JGM, de Waard MA. Functional Analysis of ABC Transporter Genes From *Botrytis cinerea* Identifies BcatrB as a Transporter of Eugenol. European Journal of Plant Pathology 2003; 109: 1003-11.

Schultz RM, Johnson EG, Wisner ER, Brown NA, Byrne BA, Sykes JE. Clinicopathologic and diagnostic imaging characteristics of systemic aspergillosis

in 30 dogs. *J Vet Intern Med* 2008; 22: 851-9.

Schwartz HJ, Greenberger PA. The prevalence of allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with asthma, determined by serologic and radiologic criteria in patients at risk. *J Lab Clin Med* 1991; 117: 138-42.

Schwiebacher MA (2005) Identifizierung und Charakterisierung von Proteinen des humanpathogenen Schimmelpilzes *Aspergillus fumigatus*, die während der Auskeimung differentiell exprimiert werden. Technische Universität München, München

Seyedmousavi S, Guillot J, Arné P, de Hoog GS, Mouton JW, Melchers WJG, Verweij PE. *Aspergillus* and aspergilloses in wild and domestic animals: a global health concern with parallels to human disease. *Medical Mycology* 2015; 53: 765-97.

Shen K-F, Osmani AH, Govindaraghavan M, Osmani SA. Mitotic regulation of fungal cell-to-cell connectivity through septal pores involves the NIMA kinase. *Molecular Biology of the Cell* 2014; 25: 763-75.

Sherif R, Segal BH. Pulmonary aspergillosis: clinical presentation, diagnostic tests, management and complications. *Curr Opin Pulm Med* 2010; 16: 242-50.

Shor E, Chauhan N. A case for two-component signaling systems as antifungal drug targets. *PLoS Pathog* 2015; 11: e1004632.

Spadinger A, Ebel F. Molecular characterization of *Aspergillus fumigatus* TcsC, a characteristic type III hybrid histidine kinase of filamentous fungi harboring six HAMP domains. *Int J Med Microbiol* 2017;

Steinbach WJ, Stevens DA. Review of newer antifungal and immunomodulatory strategies for invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* 2003; 37 Suppl 3: S157-87.

Stevens DA, Kan VL, Judson MA, Morrison VA, Dummer S, Denning DW,

Bennett JE, Walsh TJ, Patterson TF, Pankey GA. Practice guidelines for diseases caused by *Aspergillus*. Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis 2000; 30: 696-709.

Sweeney CR, Habecker PL. Pulmonary aspergillosis in horses: 29 cases (1974-1997). J Am Vet Med Assoc 1999; 214: 808-11.

Talbot JJ, Johnson LR, Martin P, Beatty JA, Sutton DA, Billen F, Halliday CL, Gibson JS, Kidd S, Steiner JM, Ujvari B, Barrs VR. What causes canine sino-nasal aspergillosis? A molecular approach to species identification. Vet J 2014; 200: 17-21.

Tasker S, Knottenbelt CM, Munro EA, Stonehewer J, Simpson JW, Mackin AJ. Aetiology and diagnosis of persistent nasal disease in the dog: a retrospective study of 42 cases. J Small Anim Pract 1999; 40: 473-8.

Thompson GR, 3rd, Patterson TF. Pulmonary aspergillosis. Semin Respir Crit Care Med 2008; 29: 103-10.

Tsai SS, Park JH, Hirai K, Itakura C. Aspergillosis and candidiasis in psittacine and passeriforme birds with particular reference to nasal lesions. Avian Pathol 1992; 21: 699-709.

Vargas-Perez I, Sanchez O, Kawasaki L, Georgellis D, Aguirre J. Response regulators SrrA and SskA are central components of a phosphorelay system involved in stress signal transduction and asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. Eukaryot Cell 2007; 6: 1570-83.

Vaughan LM. Allergic bronchopulmonary aspergillosis. Clin Pharm 1993; 12: 24-33.

Wardlaw A, Geddes DM. Allergic bronchopulmonary aspergillosis: a review. Journal of the Royal Society of Medicine 1992; 85: 747-51.

Wheat LJ. Antigen detection, serology, and molecular diagnosis of invasive mycoses in the immunocompromised host. *Transpl Infect Dis* 2006; 8: 128-39.

Wiedemann A, Kakoschke TK, Speth C, Rambach G, Ensinger C, Jensen HE, Ebel F. Distinct galactofuranose antigens in the cell wall and culture supernatants as a means to differentiate *Fusarium* from *Aspergillus* species. *Int J Med Microbiol* 2016a; 306: 381-90.

Wiedemann A, Spadinger A, Lowe A, Seeger A, Ebel F. Agents that activate the High Osmolarity Glycerol pathway as a means to combat pathogenic molds. *Int J Med Microbiol* 2016b; 306: 642-51.

Wiedemann A (2017) Neue Ansätze für die Diagnostik und die Therapie invasiver Schimmelpilzmykosen. Ludwig-Maximilians-Universität München, München

Williams JH, Phillips TD, Jolly PE, Stiles JK, Jolly CM, Aggarwal D. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2004; 80: 1106-22.

Zhang S, Corapi W, Quist E, Griffin S, Zhang M. *Aspergillus versicolor*, a new causative agent of canine disseminated aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 187-91.

Zmeili OS, Soubani AO. Pulmonary aspergillosis: a clinical update. *Qjm* 2007; 100: 317-34.

VIII. DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater und Betreuer Prof. Dr. Frank Ebel herzlich bedanken. Nicht nur für die enge Betreuung und Unterstützung während der Promotion, sondern auch für das tolle und angenehme Arbeitsklima in seiner Arbeitsgruppe, die entgegengebrachte Geduld und das jederzeit offene Ohr für die kleineren und größeren Probleme im Laboralltag. Danke auch dafür, mir die Möglichkeit gegeben zu haben, an diesem interessanten Thema mitzuarbeiten und besonders auch für die Unterstützung der Planung und Umsetzung meines weiteren beruflichen Weges.

Bei Herrn Prof. Dr. Straubinger bedanke ich mich für die herzliche Aufnahme an seinem Lehrstuhl und für die Integration in sein Team.

Dem „Süßstückle-Fanclub“ des Max von Pettenkofer-Instituts danke ich für die tollen, ersten Monate meiner Doktorarbeit und auch dafür, nach dem Wechsel in die Tiermedizin immer wieder nett aufgenommen worden zu sein.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meiner Laborpartnerin Anne Wiedemann für die tolle Zeit in unserem kleinen Pilzlabor, das wir zusammen aufgebaut haben. Es hat viel Spaß gemacht mit dir zusammen zu arbeiten und die musikalische Begleitung durch Antenne Bayern durfte natürlich nie fehlen.

Bei Christoph Kleinemeier bedanke ich mich für die technische Unterstützung, vor allem in den frühen Morgenstunden.

Danke an alle Mitglieder der AG Straubinger für die schöne Zeit und das angenehme Arbeitsklima am Institut. Ein besonderes Dankeschön geht an Shari, Tini, Marjolaine, TuPhong, Astrid und Christoph für die lustigen gemeinsamen Mittagspausen.

Zuletzt danke ich allen, die mich auf unterschiedlichste Weise während der Zeit der Promotion unterstützt und immer wieder motiviert haben.